

Geneviève LAURANS-CARBALLET

N° 1

**ETUDE ULTRASTRUCTURALE
DE L'AGENT DU TRACHOME
SOUS L'INFLUENCE DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

Le 30 Septembre 1974

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

DIPLOME D'ETAT

Président : Melle le Professeur J. ORFILA

Juges : Mr le Professeur A. GERMAN
Mr le Professeur F. PERDU
Mr le Professeur agrégé G. RIOU

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551517_0017

U.E.R DE PHARMACIE D'AMIENS

Geneviève LAURANS-CARBALLET

**ETUDE ULTRASTRUCTURALE
DE L'AGENT DU TRACHOME
SOUS L'INFLUENCE DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

Le 30 Septembre 1974

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

DIPLOME D'ETAT

Président : Melle le Professeur J. ORFILA

Juges : Mr le Professeur A. GERMAN
Mr le Professeur F. PERDU
Mr le Professeur agrégé G. RIOU



A NOTRE PRESIDENT DE JURY

Mademoiselle le Professeur Jeanne ORFILA
Titulaire de la Chaire de Bactériologie-Virologie-
Immunologie générale
Biologiste des Hôpitaux

*Vous m'avez acceptée dans votre laboratoire
avec bienveillance. J'y ai trouvé un accueil empreint
d'une grande chaleur humaine qui m'a aidée à réaliser
le travail que vous avez bien voulu me confier.*

*Votre compétence, votre clarté et vos qualités
d'enseignant sont pour moi un exemple.*

*Que ce travail soit pour vous le témoignage
de ma profonde reconnaissance.*

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. GERMAN
Professeur de Microbiologie à l'U.E.R. de Pharmacie de PARIS VII.
Pharmacien des Hôpitaux

*qui nous fait l'honneur d'être membre de ce jury.
Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance
et de notre profond respect.*

Monsieur le Professeur F. PERDU
Professeur titulaire de Physique Pharmaceutique
Directeur de l'U.E.R. de Pharmacie d'AMIENS.

*Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites
en acceptant de juger ce travail.
Nous vous en sommes très reconnaissante et vous assurons
de toute notre déférence.*

Monsieur le Professeur agrégé G. RIOU
Directeur de l'Unité de Pharmacologie moléculaire
de l'Institut Gustave Roussy

*Vous avez bien voulu vous intéresser à ce travail et
vos conseils nous seront précieux.
Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre
profond respect.*

A tous ceux qui m'ont conseillée ou qui ont participé à l'élaboration
de ce travail.

Mme BISSAC Eliane
Mr CALAIS Guy
Mme DELILLE Lisette
Mr DEVAUCHELLE Gérard
Mr EB François
Mme LECLERCQ Hélène
Mr LEFEBVRE Jean-François
Mme MARTIN Maryse

A tous mes collègues du laboratoire de Microbiologie

A la mémoire du Docteur Anita CALAIS

A MON MARI ET A MON FILS

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

ETUDE ULTRASTRUCTURALE

DE

L'AGENT DU TRACHOME SOUS L'INFLUENCE DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES

S O M M A I R E

° °
°

INTRODUCTION

2

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

6

A. MORPHOLOGIE ; CYCLE DE DEVELOPPEMENT

6

B. CARACTERES BIOCHIMIQUES

9

1. LES ENVELOPPES BACTERIENNES

9

2. LES ACIDES NUCLEIQUES

13

a- Acide désoxyribonucléique

13

b- Acide ribonucléique

16

3. METABOLISME

18

a- Les acides aminés

18

b- Glucose et glycogène

19

c- Lipides

21

d- Acide folique

21

C. STRUCTURE ANTIGENIQUE - TOXICITE

23

D. CLASSIFICATION

24

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

26

A. CULTURES CELLULAIRES

26

B. L'AGENT INFECTIEUX

27

1. HISTOIRE DE LA SOUCHE

27

2. ENTRETIEN DE LA SOUCHE AU LABORATOIRE

27

a- Inoculation à l'oeuf

28

b- Prélèvement de la membrane vitelline

28

3. PREPARATION DE L'INOCULUM INFECTIEUX DESTINE

A L'EXPERIMENTATION

29

a- Inoculum préparé directement à partir de la membrane vitelline

29

b- Utilisation d'un inoculum préparé à partir d'une culture cellulaire

30

C. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION	31
1. INOCULATION DES CELLULES	31
2. PREPARATION DES DILUTIONS D'ANTIBIOTIQUES	32
3. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	32
4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	32
a- Fixation	33
b- Déshydratations	33
c- Inclusion	34
d- Coupe	34
D. REACTIFS ET COLORATIONS	35
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	35
a- Coloration de Castaneda	35
b- Coloration de May-Grünwald-Giemsa	35
2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	36
a- Tampon cacodylate pH.7	36
b- Glutaraldéhyde	
c- Acide osmique	
d- Résine d'inclusion	
e- Acétate d'uranyle	
f- Citrate de Plomb	
 <u>CHAPITRE II : ETUDE DES TEMOINS</u>	37
A. TEMOINS CELLULES INFECTEES	38
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	38
2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	39
3. DISCUSSION	42
B. TEMOINS CELLULES NON INFECTEES ADDITIONNEES D'ANTIBIOTIQUES	46
 <u>CHAPITRE III : SULFAFURAZOLE</u>	47
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	49
2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	51
3. DISCUSSION	57

<u>CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES</u>	58
I. LES RIFAMYCINES	59
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	64
2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	66
3. DISCUSSION	68
II. CHLORAMPHENICOL	72
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	74
2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	76
3. DISCUSSION	78
III. GENTAMICINE	82
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	86
2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	88
3. DISCUSSION	90
<u>CHAPITRE V : LES ENVELOPPES BACTÉRIENNES</u>	95
I. PENICILLINE	97
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	99
2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	101
3. DISCUSSION	104
II. COLISTINE	106
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	107
2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	108
3. DISCUSSION	109
 CONCLUSIONS GÉNÉRALES	 111
PLANCHES	
BIBLIOGRAPHIE	

I N T R O D U C T I O N

o o
o

Le syndrome trachomateux est connu depuis la plus haute antiquité car les signes cliniques de cette maladie, qui atteint l'oeil et laisse des cicatrices cornéennes et palpébrales, sont déjà mentionnés dès 1500 AJC. Largement répandu en Orient et dans le Bassin méditerranéen, le trachome a vraisemblablement été disséminé en Europe occidentale par les armées françaises et anglaises lors de leur retour de la campagne d'Egypte en 1798. Au cours du XIXème siècle il disparaît du nord de l'Europe mais persiste sur le pourtour du Bassin méditerranéen : Afrique du Nord, Egypte, Moyen Orient. Les rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé estiment qu'à l'heure actuelle quatre cents millions d'hommes sont affectés par le trachome dont vingt millions sont aveugles ou suffisamment mal-voyants pour être handicapés dans leur travail.

Brièvement nous rappellerons les différentes étapes franchies depuis un demi-siècle permettant de mieux situer ce syndrome. En 1907, HALBERSTAEDTER et VON PROWAZECK arrivent à transmettre le trachome à des singes et découvrent, après coloration au Giemsa, des inclusions cytoplasmiques dans les cellules épithéliales de la conjonctive des animaux infectés ; les mêmes inclusions sont retrouvées dans la conjonctive des trachomateux. Deux ans plus tard, STARDGARDT

et LINDNER observent des inclusions identiques dans les cellules épithéliales de la conjonctive d'enfants nouveaux-nés atteints de blennorragie non gonococcique, encore appelée conjonctivite à inclusions.

Pendant longtemps les relations existant entre les deux maladies resteront mal précisées :

- La *conjonctivite à inclusions*, maladie bénigne, sporadique survenant souvent après des bains en piscine, a surtout été étudiée dans les pays tempérés. Cette infection peut également être transmise aux nouveaux-nés lors de l'accouchement si la mère est atteinte de cervicite à inclusions.

- Le *trachome* est une maladie endémique survenant généralement dans une population vivant sous un climat chaud et humide où les conditions d'hygiène sont précaires. L'atteinte cornéenne s'accompagne de séquelles qui peuvent entraîner la cécité.

La localisation intra-cellulaire des inclusions et l'impossibilité d'isoler l'agent responsable par des techniques bactériologiques avaient alors attribué la responsabilité de ces affections à un virus ; c'est d'ailleurs grâce à des techniques virologiques que T'ANG, en 1956, isole l'agent du trachome et plus tard JONES à LONDRES, celui de la conjonctivite à inclusions (72). Ces souches isolées au laboratoire, qu'elles proviennent de trachome ou de conjonctivite à inclusions ont une morphologie identique et rien ne peut les différencier si ce n'est l'origine du prélèvement et les conditions de l'isolement. Sur le plan clinique, à la suite de nombreuses observations, de l'existence de cas litigieux ainsi que d'expériences faisant appel à des volontaires, il est mal aisé de délimiter des frontières entre agent du trachome et agent de la conjonctivite à inclusions (28, 69, 70, 71, 104, 108) ; ceci sera confirmé par l'étude biochimique des souches.



Il semble par conséquent qu'il faille regarder ces deux affections comme des syndromes différents provoqués par un même agent à localisation oculaire ou génitale dont le pouvoir pathogène est fonction de la souche mais aussi de l'hôte, de ses conditions de vie, des réinfestations : la conjonctivite à inclusions pourrait constituer l'atteinte primaire alors que le trachome résulterait des réactions de l'hôte aux réinfestations. Dès lors les différentes souches isolées au cours de ces syndromes seront uniformément groupées sous l'espèce *Chlamydia trachomatis*. Celle-ci comprend en outre des souches isolées au cours d'une maladie dont la localisation est exclusivement génitale : la lymphogranulomatose vénérienne. Ainsi l'espèce *Chlamydia trachomatis* a été rendue responsable de trachome, de conjonctivite à inclusions, de lymphogranulomatose vénérienne.

Une espèce voisine *Chlamydia psittaci* est rencontrée tant chez l'homme où elle est responsable de syndromes respiratoires que chez de nombreux animaux où elle peut alors déterminer des avortements chez la brebis et la vache, une méningopneumonie chez la souris, l'ornithose chez le pigeon, la psittacose chez le perroquet, une pneumonie chez le hamster, le mouton. Ces souches sont souvent citées par le nom de la maladie qu'elles donnent. Il semble pourtant que l'on doive toutes les grouper sous le vocable de *Chlamydia psittaci*.

Ces deux espèces, jusqu'à présent réunies dans la famille des Chlamydiaceae, appartenaient à l'ordre des Rickettsiales dont les membres sont très petits et très exigeants pour leur culture ; pendant longtemps ces exigences culturelles les avaient rattaché aux virus mais les techniques modernes ont finalement montré que, malgré leur physiologie particulière, ces microorganismes devaient être rattachés au monde bactérien à cause de leur structure, de leur composition chimique et de leur équipement enzymatique.

L'emploi des antibiotiques comme outil de travail dans l'étude de ces organismes nous a paru intéressant pour deux raisons :

- leur utilisation dans la lutte contre le trachome n'est pas toujours suivie de résultats concluants et nous avons voulu voir quel était le devenir de ces agents lorsqu'ils étaient soumis à l'action de certains antibiotiques.

- ces substances inhibent spécifiquement certains stades métaboliques bactériens, bloquent des synthèses ou altèrent des structures ; les modifications obtenues seront peut-être susceptibles d'apporter des suppléments d'informations relatifs à la structure, à la composition chimique ou au métabolisme de ces agents dont certains points sont encore obscurs.

Aussi le choix des antibiotiques a-t-il été orienté en fonction de ces deux impératifs, le terme antibiotique étant utilisé dans un sens large puisque l'une de ces substances est un sulfamide. Nous avons utilisé successivement :

- Le *sulfafurazole*, sulfamide très soluble employé dans le trachome, dont l'action compétitive avec l'acide folique se répercute sur la synthèse de l'acide désoxyribonucléique.

- Trois antibiotiques intervenant sur la synthèse des protéines :

- . La *rifamycine SV* qui inhibe la polymérase-ADN dépendante responsable de la transcription du génome en acide ribonucléique.

- . Le *chloramphénicol* dont l'action au niveau de la sous-unité 50 S des ribosomes bloque la traduction de l'acide ribonucléique messager.

- . La *gentamicine* qui, comme la streptomycine, agit sur la sous-unité 30 S des ribosomes.

- Et enfin deux antibiotiques dont le point d'impact se situe au niveau des enveloppes bactériennes :

- . La *pénicilline* inhibant la synthèse du mucopeptide de la paroi.
- . La *colistine* qui altère la membrane cytoplasmique.

Dans la première partie nous exposerons les généralités concernant les Chlamydiae, c'est-à-dire essentiellement leurs caractères morphologiques et biochimiques dont la connaissance sera utile aux discussions qui suivront les descriptions.

La seconde partie rapportera nos travaux personnels ; elle sera divisée en plusieurs chapitres :

- le premier chapitre sera consacré au matériel et aux techniques utilisés.

- le deuxième chapitre montrera l'aspect et la structure de l'agent infectieux et des inclusions tels que nous les avons observés d'après notre protocole expérimental sans l'addition des antibiotiques.

- le troisième, le quatrième et le cinquième chapitres seront successivement consacrés au sulfafurazole, aux trois antibiotiques bloquant la synthèse des protéines puis à ceux dont l'action se situe au niveau des enveloppes bactériennes.

Enfin nous tirerons les conclusions de ce travail.

P R E M I E R E P A R T I E

◦ ◦
◦

GENERALITES

° °
°

L'adaptation des souches de Chlamydiae en lignée cellulaire in vitro — qui n'est pas toujours possible pour certaines d'entre elles — a permis de préciser leur morphologie et leurs caractères biochimiques. Ce sont des parasites intra-cellulaires obligatoires, immobiles, à Gram négatif, ayant tous la même morphologie. Ils se multiplient dans le cytoplasme de leur cellule-hôte selon un cycle de développement complexe dont la durée varie en fonction du système hôte-parasite impliqué.

A. MORPHOLOGIE ; CYCLE DE DEVELOPPEMENT.

Dès la découverte de l'agent de la psittacose BEDSON avait déjà observé les modifications morphologiques et tinctoriales subies par cet agent au cours de son développement intra-cellulaire (17, 18, 19).

Les études en microscopie photonique, après coloration au Giemsa, montrent la présence près du noyau, au bout de 12 à 18 heures, d'une petite vacuole d'inclusion d'aspect mûriforme, la *moruža*, colorée en bleu foncé. Cette inclusion intra-cytoplasmique grandit et renferme de nombreux granules violet pourpre bien distincts (*Planche 1 - Fig. 1*). En 48 à 72 heures, l'inclusion remplit presque tout le cytoplasme de la cellule, refoule le noyau à

la périphérie et distend la cellule au point de la faire éclater, libérant ainsi les particules infectieuses.

Les techniques de microscopie électronique ont précisé la structure des particules contenues dans l'inclusion. Trois types de particules peuvent être observés :

- le *corps élémentaire* qui mesure environ 0,3 μ m de diamètre. Sphérique, rigide, non déformable, il possède un nucléoïde excentré opaque aux électrons et une zone fibrillaire ponctuée de granules qui sont des ribosomes (*Planche 1 - Fig. 2*).

- le *corps intermédiaire* mesure environ 0,5 μ m; il possède un nucléoïde comme le corps élémentaire mais en position centrale (*Planche 1 - Fig. 4*).

- le *corps initial* atteint quelquefois 1 μ m; sans nucléoïde il ne comporte qu'un réseau fibrillaire et des granulations ribosomales dont la répartition se fait de façon prépondérante à la périphérie du corps (*Planche 1 - Fig. 2*). Certains sont plus gros, allongés et présentent une constriction médiane qui est l'amorce d'une fission binaire (*Planche 1 - Fig. 5*).

De nombreuses études ultrastructurales ont été réalisées sur différentes souches de Chlamydiae : ANDERSON et coll. (3), KAJIMA et coll. (73), HIGASHI (59, 60), ERLANDSON et coll. (41), LEPINAY et coll. (81) ont examiné des souches d'ornithose et de psittacose, de méningopneumonie de la souris ; ARMSTRONG et coll. (4, 5, 6), EB et coll. (39) ont étudié des souches de lymphogranulomatose vénérienne, et MITSUI et coll. (105, 106, 109), HIGASHI (59) celles du trachome et de la conjonctivite à inclusions.

Quelle que soit la souche étudiée l'allure générale du phénomène est le même et le cycle de développement de chacun de ces agents peut se schématiser de la façon suivante : un corps élémentaire infectieux pénètre dans le cytoplasme de la cellule-hôte après phagocytose et se retrouve intact dans une petite vacuole dont la membrane est dérivée de celle de la cellule. Au bout de 5 à 6 heures ce corps élémentaire se réorganise en un corps initial, forme de multiplication de ces agents. Les corps initiaux grossissent, s'allongent et se divisent par fission binaire. Ce processus se répète un certain nombre de fois entraînant l'augmentation du volume de la vacuole d'inclusion puis la plupart des corps initiaux se réorganisent en corps élémentaires ; la forme de passage entre ces deux particules est le corps intermédiaire.

Les trois types de particules sont présents simultanément dans les vacuoles d'inclusion arrivées à la fin du cycle de développement, (*Planche 1 - Fig. 6*). Les nouveaux corps élémentaires infectieux ainsi formés iront, après éclatement de la cellule, parasiter d'autres cellules.

Les techniques de microscopie photonique ne permettent pas d'observer les inclusions avant la 18ème heure environ ce qui avait été interprété comme une phase d'éclipse. En réalité la disparition de la particule infectieuse n'est qu'apparente et sa mise en évidence est fonction de la sensibilité de la technique. En effet la microscopie électronique a montré que les corps élémentaires ou initiaux étaient continuellement présents et commençaient à se multiplier dès la 6ème heure ; la phase d'éclipse correspond en fait à une période pendant laquelle les particules ne sont pas assez nombreuses pour être détectées par les méthodes cytochimiques utilisées en microscopie photonique.

Le mécanisme de la division cellulaire n'est pas encore bien connu. La fission binaire représente sans doute l'éventualité la plus fréquente : une constriction médiane survient dans un corps initial et cloisonne les deux extrémités de ce corps donnant naissance à deux cellules-filles. Quant à la réorganisation du corps initial en corps élémentaire avec passage par la forme corps intermédiaire son mécanisme est encore inconnu. Cette réorganisation est caractérisée par une réduction de taille, l'apparition du nucléoïde et la formation d'une paroi rigide.

B. CARACTERES BIOCHIMIQUES.

1. *LES ENVELOPPES BACTERIENNES.*

Les techniques de microscopie électronique et de biochimie ont permis de déterminer la structure et la composition chimique des enveloppes qui entourent corps élémentaires et corps initiaux.

Du point de vue *structural* ERLANDSON et ALLEN (41) étudiant l'agent de la méningopneumonie n'avaient observé qu'une seule membrane de type "unit membrane", alors que MITSUI (106) sur l'agent du trachome et ARMSTRONG et REED (5) sur l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne signalent deux systèmes membranaires. ANDERSON (3), à la suite de travaux comparatifs avec des Rickettsies, conclut que l'agent de l'ornithose possède une véritable paroi et une membrane cytoplasmique qui souvent est peu visible sur les coupes de microscopie électronique. Les travaux de TAMURA et coll. (161, 164) en préciseront la structure : des suspensions purifiées de corps élémentaires et de corps initiaux de l'agent de la méningopneumonie ainsi que de leurs enveloppes sont préparées,

incluses en résine et examinées au microscope électronique. Dans chacun des organismes intacts et dans leurs enveloppes partiellement purifiées deux structures membranaires peuvent être observées, chacune apparaissant comme deux couches colorées en noir, opaques aux électrons :

- le *corps élémentaire* présente une membrane externe, sphérique, *rigide* qui résiste à l'action de détergent comme le dodécyl sulfate de sodium à 0,5 %. La couche interne a une forme irrégulière et disparaît complètement après traitement détergent. Les auteurs en concluent que la couche externe est la paroi alors que la couche interne est la membrane cytoplasmique.

- les *corps initiaux* ont une paroi nettement visible mais non rigide. La membrane cytoplasmique existe, bien que moins visible que dans le corps élémentaire ; des traitements effectués par des nucléases ou des détergents la font disparaître tandis que la paroi persiste.

La paroi est donc présente aussi bien dans le corps élémentaire que dans le corps initial, c'est-à-dire tout au long du cycle de croissance de l'agent, mais elle subit des modifications : la fragilité et le manque de rigidité du corps initial doivent être dus à un changement dans la composition chimique ou la structure de la paroi.

Poursuivant ces travaux, MATSUMOTO et MANIRE (102) réalisent après une purification des corps élémentaires et des corps initiaux suivie d'un traitement aux ultrasons, un ombrage métallique des parois isolées qu'ils examinent au microscope électronique :

- la couche interne de la paroi des corps élémentaires semble formée de structures macromoléculaires d'un diamètre approximatif de 18 nm assemblées selon un schéma hexagonal. La couche externe est granuleuse. Les parois de ces corps traités par la formamide à chaud — utilisée par de nombreux auteurs pour

isoler les composants du peptidoglycane des parois bactériennes — puis centrifugées en gradient de tartrate de potassium permettent l'isolement de particules hexagonales d'environ 20 nm de diamètre. L'assemblage de ces particules constitue l'arrangement géométrique observé dans la couche interne de la paroi.

- les parois des corps initiaux récoltées 18 heures après le début de l'infection ne montrent aucune de ces structures régulières.

Les auteurs pensent donc que cet assemblage géométrique de sous-unités macromoléculaires localisé dans la couche interne de la paroi des corps élémentaires, doit être responsable de la rigidité structurale de ces corps ; ces sous-unités sont synthétisées au cours du processus de maturation lors de la transformation du corps initial en corps élémentaire. Le corps élémentaire qui possède cette structure sera donc rigide, alors que le corps initial est déformable, fragile. L'extraction par la formamide à chaud permet d'entrevoir la nature glycopeptidique de ce composé dont l'assemblage est inhibé par la pénicilline comme nous le verrons ultérieurement.

Les premières *analyses biochimiques* de ces enveloppes remontent à 1960, date à laquelle JENKIN (64) tente de les purifier et d'en analyser les constituants ; des chromatographies effectuées après leur extraction d'un mélange de particules traitées au désoxycholate et à la trypsine mettent en évidence :

- une dizaine d'acides aminés (Asparagine, Alanine, Glutamine, Glycocolle, Méthionine, Valine, Thréonine, Sérine, Phénylalanine), des petites quantités de lysine mais pas d'acide diaminopimélique.

- des hexosamines et des sucres réducteurs ainsi que des traces d'acide muramique ce que confirmeront les résultats de PERKINS et ALLISON en 1963 (131).

- de grandes quantités de phospholipides.
- des traces d'acides nucléiques.

Ces analyses avaient été effectuées sur un mélange des deux types de particules rencontrées dans l'inclusion.

En 1967, TAMURA et MANIRE (97, 161) réussissent à séparer les corps élémentaires et les corps initiaux ; ils purifient les enveloppes de ces corps à l'aide de techniques de centrifugation en gradient de saccharose suivies de traitement à la trypsine et au dodécyl sulfate de sodium ; ils obtiennent ainsi des préparations de parois hautement purifiées comme le confirme l'observation en microscopie électronique après coloration négative. Les résultats sont les suivants :

- les enveloppes du corps élémentaire représentent 13 % du poids sec des corps intacts ; elles contiennent 72 % de protéines, des traces d'acides nucléiques et des petites quantités de lipides dont la majorité est constituée de phospholipides. Les proportions de ces constituants ont été établies ainsi que la composition en acides aminés.

- la quantité de phospholipides présente dans les membranes des corps initiaux est moins grande que celle qui est contenue dans les membranes des corps élémentaires ; ceci peut expliquer qu'au cours des centrifugations les parois des corps élémentaires soient moins denses que celles des corps initiaux.

- Quant à la répartition des acides aminés, elle est semblable à celle que l'on trouve chez les bactéries à Gram négatif tel l'Escherichia coli ; il existe toutefois une petite différence entre les deux types de particules : la Cystéine et la Méthionine sont absentes dans les corps initiaux et présentes dans les corps élémentaires. La présence de ces acides aminés soufrés, capables de former des ponts disulfures contribue peut-être à la rigidité de la paroi des corps élémentaires.

Signalons qu'avec cette technique TAMURA et MANIRE n'ont mis en évidence que des petites quantités de glucides (glucosamine et galactosamine) mais pas d'acide muramique, ni d'acide diaminopimélique.

2. LES ACIDES NUCLEIQUES.

α - Acide désoxyribonucléique

En microscopie électronique l'acide désoxyribonucléique (ADN) apparaît dans les corps initiaux sous forme de filaments enchevêtrés répartis à travers tout le cytoplasme tandis que dans les corps élémentaires ces filaments sont condensés en un nucléoïde opaque aux électrons. Des études physiques et biochimiques de l'ADN ont été entreprises, tant sur les souches de Chlamydia psittaci que sur celles de Chlamydia trachomatis, dans le but de préciser leur position taxonomique.

A l'aide de techniques utilisées en virologie et permettant d'obtenir des génomes intacts, SAROV et BECKER (147) ont isolé l'ADN de l'agent du trachome à partir de corps élémentaires infectieux. Ils ont montré par des mesures effectuées en microscopie électronique et des déterminations en gradient de saccharose, que le chromosome était constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire, sans extrémités libres, dont la longueur moyenne est de 342,5 μ m et le poids moléculaire de 660×10^6 daltons ce qui correspond à 11×10^5 paires de nucléotides. Des valeurs inférieures (6×10^5) avaient été trouvées par KINGSBURY (75) avec une technique différente.

La composition en bases, exprimée comme le pourcentage des bases Guanine + Cytosine (GC %), a été faite soit par détermination de la densité à l'équilibre en gradient de chlorure de césium soit par l'étude de la température de dénaturation à la chaleur. Toutefois ces expériences nécessitent fréquemment un supplément d'information apporté par les techniques d'hybridation de l'ADN. Les résultats obtenus varient en fonction des techniques utilisées

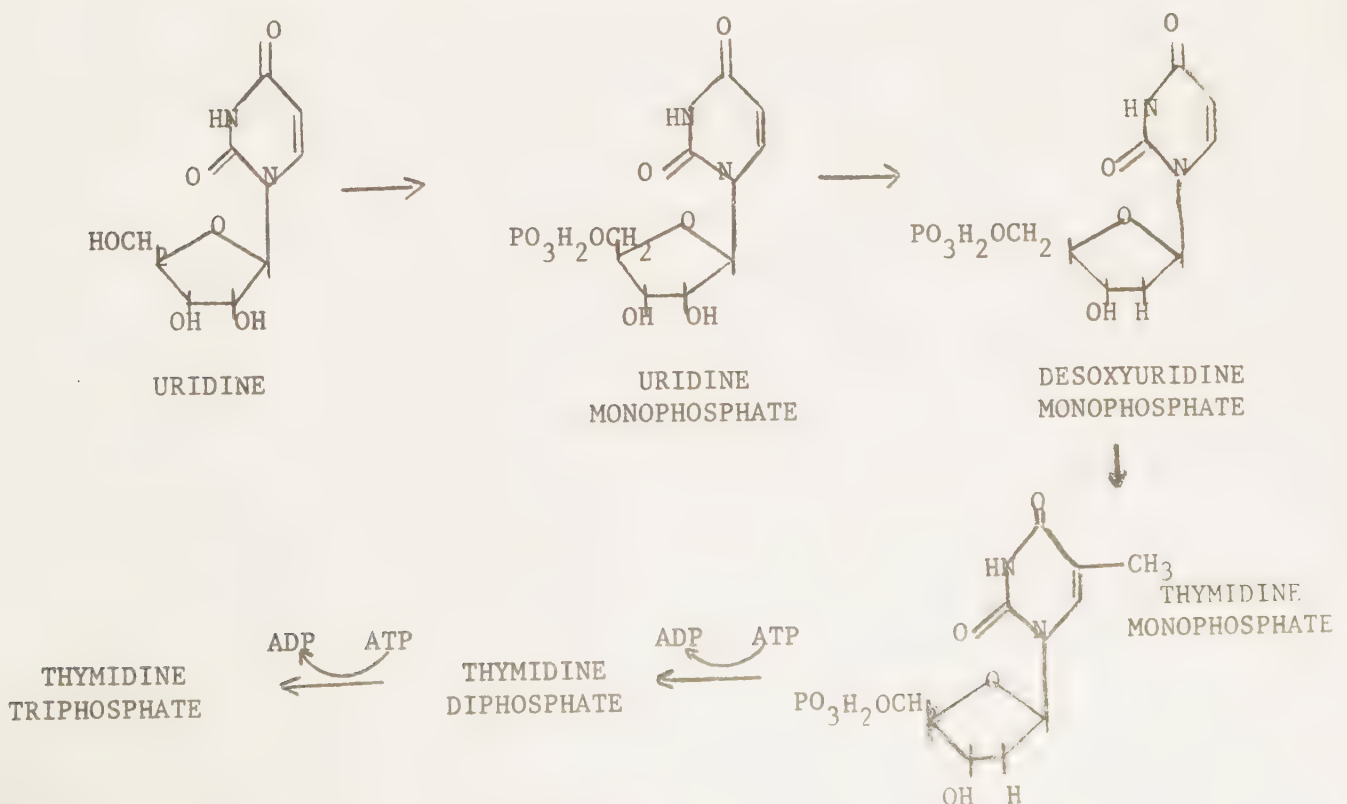
(48, 49, 76, 187) : toutefois il semble que le GC % des souches de Chlamydia psittaci soit inférieur à celui des souches de Chlamydia trachomatis pour lequel WEISS trouve 42 % (190). Par ailleurs, après hybridation il est surprenant de constater qu'il n'existe guère plus de 10 % de réactions homologues entre les souches de Chlamydia psittaci et celles de Chlamydia trachomatis (76).

Les colorations cytochimiques en microscopie photonique et surtout les techniques biochimiques d'incorporation de nucléosides radioactifs ont permis d'étudier la *synthèse* de l'ADN. BERNKOPF et coll. (20) détectaient sa présence par la réaction de Feulgen à partir de la 20ème heure dans les cellules L infectées par l'agent du trachome. L'intensité de la coloration était maximum vers la 24ème heure. L'incorporation des nucléosides marqués a montré que cette synthèse était continue pendant tout le cycle de croissance intracellulaire des Chlamydiae. ALEXANDER (1) a pu suivre la synthèse de l'ADN de l'agent de la méningopneumonie dans les cellules L traitées par le cycloheximide ; cette substance, qui inhibe la synthèse des protéines des cellules L — sans effet sur la multiplication ou la synthèse des protéines de Chlamydia psittaci — inhibe aussi plus de 90 % de la synthèse de l'ADN de la cellule-hôte après 3 heures de contact. De telles cellules infectées par l'agent de la méningopneumonie permettent donc de suivre la synthèse de l'ADN de l'agent pendant sa croissance intra-cellulaire. Dans ces conditions cette synthèse est détectée 10 à 12 heures après l'infection, c'est-à-dire aussitôt après que la division de l'agent ait pu être observée en microscopie électronique. Le taux auquel les précurseurs marqués sont incorporés dans l'ADN de l'agent double toutes les 2 heures ce qui correspond au temps de génération des corps initiaux.

Ces résultats rejoignent les données expérimentales de BECKER (15) sur la synthèse des acides nucléiques de l'agent du trachome. Pendant son cycle de développement la synthèse de l'ADN croît progressivement, passe par un maximum vers la 35ème heure et décroît ensuite ; elle est plus lente que celle des ARN.

Les précurseurs de l'ADN chez les Chlamydiae ont été étudiés par TRIBBY et MOULDER (173) chez l'agent de la méningopneumonie cultivé en cellules L. L'adénine, la guanine et la cytosine exogènes ainsi que leurs nucléosides, sont incorporés par la cellule-hôte et par l'agent ; l'uracile et la thymine ne le sont que faiblement. Par contre la cellule-hôte utilise la thymidine pour la synthèse de son ADN alors que l'agent de la méningopneumonie ne l'incorpore pas du tout, probablement parce qu'il lui manque la kinase correspondante. Ceci suffit à démontrer que l'hypothèse selon laquelle les Chlamydiae fabriquaient leurs acides nucléiques à partir des nucléosides triphosphates de leurs hôtes était fausse.

Les auteurs pensent que la thymidine triphosphate utilisée pour la synthèse de l'ADN de l'agent est faite selon le schéma 1.



Il n'en existe pas moins des relations hôte-parasite très importantes ; certains auteurs ont montré que la multiplication des Chlamydiae retentissait sur la synthèse des acides nucléiques de la cellule-hôte (2, 32, 86, 87, 112, 130, 151) : l'infection des cellules L par l'agent de la méningopneumonie entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines de l'hôte quand ces cellules sont en phase exponentielle de croissance, alors qu'aucun changement n'est remarqué quand les cellules sont en phase stationnaire. Les auteurs pensent que probablement il existe une compétition dans l'utilisation de métabolites à haut rendement énergétique.

b- Acide ribonucléique

SAROV et coll. (149) ont isolé dès 1966 les acides nucléiques contenus dans les corps élémentaires de l'agent du trachome. Après culture de l'agent en présence de cytidine tritiée et grâce aux techniques biochimiques d'ultracentrifugation en gradient de saccharose, d'électrophorèse en gel d'acrylamide et de comptage des particules radioactives, des études ultérieures leur ont permis d'individualiser quatre types d'acides ribonucléiques (15) :

- des molécules d'ARN 23 S et 16 S, situées respectivement dans les sous-unités ribosomales 50 S et 30 S.

- des molécules 5 S qui participent à la formation des sous-unités ribosomales, et des molécules 4 S vraisemblablement t-ARN.

Cette technique ne leur avait permis d'isoler que des sous-unités ribosomales ; TAMURA (159, 160), utilisant des homogénats obtenus à partir de corps initiaux de l'agent de la méningopneumonie en présence de fortes concentrations de $MgCl_2$ a pu observer des particules 70 S. Ces particules, identifiées comme des ribosomes, se dissocient en sous-unités 50 S et 30 S lorsqu'elles sont dialysées contre des solutions de concentrations faibles en $MgCl_2$.

Ces ribosomes ont d'ailleurs pu être observés en microscopie électronique. Après ombrage métallique de préparations renfermant des corps initiaux rompus par agitation mécanique, ils apparaissent comme des particules de 15 μ m environ. En coupe fine de cellules parasitées, ils se disposent de façon prépondérante à la périphérie des corps initiaux, formant une couronne granuleuse qui entoure les filaments d'ADN. Dans les corps élémentaires ces grains se trouvent concentrés dans la portion de cytoplasme non occupé par le nucléoïde excentré.

Ce sont typiquement des ribosomes de procaryotes. En effet le cycloheximide qui bloque la synthèse des protéines chez les eucaryotes est sans effet sur celle des Chlamydiae : ALEXANDER a montré que des cellules L infectées par l'agent de la méningopneumonie et traitées par le cycloheximide incorporaient quand même des acides aminés marqués (1, 2).

Ces résultats ont été confirmés par BECKER avec l'agent du trachome en présence d'émétine (11).

La mise en évidence de la *synthèse* d'ARN au cours du cycle évolutif de l'agent du trachome a d'abord été faite à l'aide de colorations cytochimiques puis de techniques d'incorporation de nucléosides radioactifs.

POLLARD et TANAMI (135) utilisant l'acridine orange, détectent cette synthèse dès la 14ème heure après l'infection, en microscopie photonique. BECKER et coll. (15) l'étudient en suivant l'incorporation de cytidine tritiée. Ils constatent que le taux maximum est atteint vers la 20ème heure et que cette synthèse est continue pendant tout le cycle de croissance. Afin d'étudier la destinée de l'ARN synthétisé dans les inclusions, les cellules infectées sont mises en contact avec la cytidine tritiée pendant 8 heures à différents temps

du cycle ; à la fin de chaque période de marquage l'isotope est enlevé et remplacé par du milieu frais. Les corps élémentaires sont récoltés en fin de cycle et la radioactivité déterminée. Les auteurs ont ainsi constaté que l'ARN synthétisé pendant le cycle de croissance était incorporé dans les nouveaux corps élémentaires formés ; et que la quantité d'ARN incorporée augmentait jusqu'à la 24ème heure, restait inchangée à la 32ème heure puis diminuait.

Le fonctionnement de ces ARN aboutit à la formation des protéines dont la synthèse est continue pendant tout le cycle de croissance comme l'ont montré BECKER et coll. en bloquant la synthèse des protéines de la cellule-hôte (11). L'incorporation des acides aminés radioactifs dans les protéines de l'agent du trachome est détectée de la 12ème à la 48ème heure. Le taux de synthèse est faible jusqu'à la 12ème heure du cycle puis il augmente exponentiellement jusqu'à la 42ème heure. A la fin du cycle le taux de synthèse des protéines est identique à celui qui est observé dans les cellules non infectées.

3. METABOLISME.

L'étude des exigences métaboliques des Chlamydiae, parasites intracellulaires obligatoires, est difficile car elle ne peut se faire qu'à travers les exigences de leur cellule-hôte.

a- Les acides aminés

Les besoins en acides aminés ont été étudiés pour différentes souches. OSSOWSKI et coll. (125) ont montré que l'addition de sérine à des souches de trachome cultivées en cellules FL augmentait leur titre infectieux de plus de 100 fois. Seule l'addition combinée d'alanine, de glycocolle et d'acide glutamique conduisait à une augmentation comparable, quoique plus faible, du titre

infectieux. Cependant cette exigence en sérine n'est pas apparente quand la culture se fait dans d'autres types de cellules, telles les cellules de reins humains. Les mêmes expériences réalisées avec la souche 6 BC de psittacose montrent l'indifférence de cette souche vis-à-vis de la sérine, comme d'ailleurs vis-à-vis de l'histidine, de l'arginine et la lysine alors que la croissance des souches de trachome est complètement inhibée en l'absence de ces trois acides aminés.

Ces expériences soulignent les étroites relations métaboliques qui existent entre la cellule-hôte et le parasite ainsi que les divergences entre Chlamydia trachomatis et Chlamydia psittaci.

Il faut noter que ces acides aminés ont été trouvés en quantités non négligeables dans les protéines de l'agent de la méningopneumonie et qu'une synthèse de lysine à partir du diaminopimélate a été obtenue dans des suspensions de cet agent par MOULDER (117).

b- Glucose et glycogène

A la suite des travaux de WEISS et de MOULDER il est maintenant bien établi que les Chlamydiae catabolisent le *glucose*.

Dès 1963 ORMSBEE et WEISS (123) observent un dégagement de CO₂ radioactif à partir d'une suspension purifiée de souche de trachome mise en présence de glucose marqué au C 14 dans un appareil de Warbourg. Ces travaux repris par WEISS et coll. (186, 187, 189, 190, 192) généralisent ces résultats à d'autres agents : psittacose, méningopneumonie, pneumonie des félins, pneumonie de la souris, conjonctivite à inclusions. Aucune consommation d'oxygène n'est enregistrée. Au cours de ces expériences des chromatographies destinées à isoler les acides cétoniques ont été réalisées sur la mixture de réaction : seul de l'acide pyruvique marqué au C 14 a pu être isolé mais pas d'acide α -cétoglutarique.

Ultérieurement MOULDER (115, 116) a essayé d'isoler les enzymes impliqués dans ce métabolisme. Il a mis en évidence trois enzymes dégradant le glucose par la voie des pentoses :

- une glucose 6-phosphate deshydrogénase
- une 6-phosphogluconate deshydrogénase
- une phosphoglucose isomérase.

Cependant les résultats obtenus laissent penser qu'il existe sans doute parallèlement une autre voie métabolique de dégradation. D'autre part la présence d'acide pyruvique mais pas celle d'acide alpha-cétoglutarique montre que le cycle de Krebs n'est pas opérationnel.

L'influence de différents facteurs impliqués dans ce catabolisme a été étudiée par WEISS (186, 190, 192) sur l'agent de la méningopneumonie ; il ressort de ces expériences que l'adénosine triphosphate (ATP) et les cations divalents (Mg^{++} , Mn^{++}) sont indispensables à ce catabolisme alors que le nicotinamide dinucléotide (NAD) est sans effet.

Dans plusieurs de ces expériences l'addition d'hexokinase entraînait une augmentation considérable de la production de CO_2 montrant ainsi que le glucose 6-phosphate était utilisé préférentiellement au glucose. Le remplacement du glucose par le glucose 6-phosphate rend inutile l'addition d'ATP. Le rôle de ce dernier dans ce catabolisme se réduit sans doute à transformer le glucose en glucose 6-phosphate, ce qui suggère que ces microorganismes possèdent une hexokinase, bien que MOULDER n'ait pu démontrer sa présence sans doute à cause de la labilité de cette enzyme (116).

Ce catabolisme ne semble donc pas engendrer d'énergie, et il semble que pour celle-ci les Chlamydiae soient dans l'obligation d'avoir recours à leur cellule-hôte. Les travaux de GILL (50) ont d'ailleurs montré que des cellules L parasitées par une souche de Chlamydia psittaci présentaient une

consommation accrue en glucose et en oxygène due à une augmentation de la phosphorylation oxydative et que les taux d'ATP diminuaient lors de l'infection alors que les taux d'ADP augmentaient.

Quant au *glycogène* dont la présence à l'intérieur des inclusions rencontrées dans les cellules épithéliales des frottis de conjonctive des sujets trachomateux avait été signalée par RICE dès 1936 (140), son métabolisme n'est pas élucidé. En 1965 GORDON et QUAN (54) recherchent sa présence dans 27 souches de *Chlamydiae* à l'aide de la coloration à l'iode ou au PAS. Utilisant le même système cellulaire pour chacune de leurs expériences ils ne trouvent ce glycogène que chez certaines souches seulement et le proposent comme critère taxonomique.

c- Lipides

La présence de lipides a été signalée chez les *Chlamydiae* par plusieurs auteurs (94, 114) ; leur synthèse a été étudiée par GAUGLER et coll. (46) qui ont montré que des suspensions purifiées de l'agent de la méningo-pneumonie incubées pendant 4 heures à 34° avec de l'aspartate, de l'isoleucine et du glucose 6-phosphate marqué au C 14 en présence d'hexokinase synthétisaient des lipides, car la radioactivité se retrouvait au niveau de cette substance. Ces lipides ont pu être identifiés : il s'agit de lipides neutres, présents en faible quantité et de phospholipides, essentiellement phosphatidyl éthanolamine.

d- Acide folique

Dès 1948, MORGAN (113) avait étudié systématiquement l'action des sulfamides sur ces agents. Il avait ainsi montré que sur embryon de poulet

l'agent de la méningopneumonie était insensible aux sulfamides alors que la multiplication de la souche 6 BC de psittacose était inhibée par la sulfadiazine. Cette inhibition était réversée compétitivement par l'acide para-aminobenzoïque, et non compétitivement par l'acide ptéroylglutamique. Ces résultats démontraient l'importance de l'acide ptéroylglutamique ou acide folique dans la croissance du germe.

Ultérieurement la découverte du mécanisme d'action des sulfamides qui empêchent l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque au cours de la synthèse de l'acide folique chez les bactéries, apporta des éléments nouveaux. Puisque les sulfamides inhibaient la croissance de certains agents, il était logique de penser que ces derniers étaient capables de synthétiser l'acide folique à partir de ces composants et que les agents sulfamido-résistants n'en étaient pas capables et devaient le recevoir d'une source exogène. COLON¹ et MOULDER (31) entreprirent alors d'examiner la teneur en acide folique de plusieurs de ces agents ; les préparations purifiées étaient constituées de corps élémentaires des agents de la pneumonie des félins, de la pneumonie de la souris, de la méningopneumonie de la souris et de psittacose. La teneur en acide folique était déterminée par essai microbiologique à l'aide de Lactobacillus casei et de Pediococcus cerevisiae. Chacun de ces agents contenait des quantités relativement constantes d'acide folique par gramme d'azote total et à des taux significatifs. L'acide folique semblait donc être un constituant intrinsèque de ces agents.

D'autres expériences vinrent le confirmer (29, 30) : la formation du facteur citrovorum ou acide N₅-formyltétrahydrofolique a pu être mise en évidence chez l'agent de la pneumonie de la souris ; une suspension purifiée de cet agent incubée à 37° montre une augmentation nette de la teneur en facteur citrovorum, laquelle est inhibée par la sulfadiazine alors que l'agent de la méningopneumonie est indifférent aux sulfamides.

L'action de la sulfadiazine sur les agents de la famille des Chlamydiaceae les a partagés en deux sous-groupes (88) :

- les uns, tels l'agent du trachome, de la lymphogranulomatose vénérienne, de la conjonctivite à inclusions, de la pneumonie de la souris, sont sensibles aux sulfamides et leur multiplication est inhibée. Ils possèdent donc un système enzymatique capable de synthétiser l'acide folique à partir de ces composants, quelle que soit la concentration d'acide folique exogène dans le milieu ; cette synthèse est nécessaire à leur multiplication.

- les autres, appartenant au groupe psittacose sont résistants aux sulfamides ; ils ne possèdent pas le même système enzymatique et doivent trouver de l'acide folique dans le milieu extérieur, lequel sera ensuite transformé en leurs propres facteurs vitaminiques.

C. STRUCTURE ANTIGENIQUE - TOXICITE.

La composition antigénique des Chlamydiae est complexe et mal connue. Deux catégories d'antigènes ont pu être caractérisées (37, 43, 65, 137) :

- des *antigènes de groupe* dont les anticorps correspondants réagissent avec tous les membres des Chlamydiae ; extraits par le desoxycholate, ils sont inactivés par le périodate ce qui fait penser que leur nature est glucidique inclus au sein d'un complexe protéino-lipido saccharidique. Ils sont présents à travers tout le cycle de croissance de l'agent.

- des *antigènes d'espèces*, également localisés dans les enveloppes des différents agents dont la nature est inconnue.

Inoculées à fortes doses à des souris ou des oeufs de poule embryonnés, les Chlamydiae sont très toxiques ; cette toxicité est vraisemblablement liée à la présence des corps élémentaires (27, 169).

D. CLASSIFICATION.

Depuis 1966, PAGE (127) s'appuyant sur les travaux de GORDON et QUAN (54, 55, 56) a regroupé les nombreux agents de cette famille isolés au cours de différents syndromes, tant chez l'homme que chez les animaux, en deux espèces au sein du genre Chlamydia. Les nouveaux critères taxonomiques reposent, non plus sur l'hôte qui hébergeait l'agent ou le syndrome qu'il provoquait (85) mais sur les données morphologiques et biochimiques (150).

Le genre Chlamydia est défini par la morphologie et le mode de reproduction de ces agents. Obligatoirement intra-cellulaires, ils possèdent tous un cycle de croissance caractérisé par l'évolution d'un corps élémentaire infectieux en un corps initial qui se divise par fission binaire. Les divisions se poursuivent tandis que quelques cellules-filles diminuent progressivement de taille et redonnent finalement des corps élémentaires infectieux.

Ces inclusions, véritables microcolonies intra-cytoplasmiques, dont la taille varie de 2 à 12 μ m, contiennent à maturation tous les stades évolutifs de l'agent : corps élémentaire, corps intermédiaire, corps initial.

Deux espèces sont séparées :

- *Chlamydia trachomatis* dont les inclusions intra-cytoplasmiques sont, dès le début de l'infection, rigides, compactes, bien délimitées au sein du cytoplasme. Les agents appartenant à cette espèce accumulent du glycogène à l'intérieur de l'inclusion en quantité suffisante pour être détectée en microscopie photonique par une solution de lugol (réaction de Rice). Leur croissance est inhibée par la sulfadiazine ce qui signifie qu'ils sont capables de synthétiser leur propre acide folique.

Parmi eux citons les agents du trachome, de la conjonctivite à inclusions, de la lymphogranulomatose vénérienne, de la pneumonie de la souris.

- *Chlamydia psittaci* possède les 24 premières heures du cycle des inclusions diffuses, mal délimitées, donnant l'impression que ces agents sont éparpillés au sein du cytoplasme. Leurs inclusions ne contiennent pas de glycogène et ils sont résistants à la sulfadiazine. Cette espèce comprend l'agent de la méningopneumonie de la souris, de l'ornithose, de la psittacose, de la pneumonie des félins, de l'encéphalomyélite bovine.

Toutefois ces distinctions ne sont pas toujours très nettes et de nombreuses exceptions existent dans les deux espèces. Cette classification ne semble pas définitive et récemment un nouvel ordre, celui des Chlamydiales a été proposé (156).

Les agents isolés à partir de trachome ou de conjonctivite à inclusions sont depuis 1962 appelés agents TRIC (Trachoma-Inclusion Conjunctivitis). Cette dénomination est suivie du groupe antigénique quand il est connu, du lieu géographique où a été isolée la souche, de son numéro d'isolement et de l'origine clinique du prélèvement (47).

Les abréviations admises sont les suivantes :

- T = Trachome
- C = Conjonctivite
- N = Ophtalmie néo-natale
- O = Oeil
- G = Tractus génital

La souche de conjonctivite à inclusions que nous avons utilisée s'appelle ainsi : TRIC/ /GB/MRC₄/ON ; il s'agit de la quatrième souche de conjonctivite à inclusions isolée à l'Institut du Medical Research Council de LONDRES (Grande-Bretagne) lors d'un prélèvement oculaire chez un enfant atteint d'ophtalmie néo-natale. Son groupe antigénique est inconnu.

D E U X I E M E P A R T I E

• •
•

CHAPITRE I

- MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES -

° °
°

A. CULTURES CELLULAIRES.

Nous avons utilisé les *cellules KB*, de type épithélial. Cellules en lignée continue elles sont entretenues au laboratoire dans un milieu contenant de l'hydrolysate de caséine, du bicarbonate de sodium à 55 ‰, du sérum de veau à 10 % et de la streptomycine à 50 µg/ml.

Au moment de l'expérience les cellules sont détachées de la paroi du flacon à l'aide d'une solution de trypsine à 0,25 %, dissociées par agitation dans le milieu d'entretien puis réparties :

- en flacons de verre de 60 ml à parois latérales plates destinés à la microscopie électronique ;

- en tubes de Leighton contenant une lamelle de verre de 12 x 32 mm pour l'étude en microscopie photonique.

Les cellules ainsi réparties sont cultivées à 37° pendant 3 jours, temps nécessaire à l'obtention d'un tapis cellulaire continu.

Après inoculation, l'hydrolysate de caséine est remplacé par le milieu semi-synthétique 199 de Parker additionné de bicarbonate de sodium à 55 ‰, de sérum de veau à 5 % et de streptomycine à 50 µg/ml.

B. L'AGENT INFECTIEUX.

1. HISTOIRE DE LA SOUCHE.

Elle a été isolée en 1961 sur membrane vitelline d'oeuf de poule embryonné, à partir d'un prélèvement oculaire effectué par le Professeur JONES chez un nouveau-né atteint de conjonctivite à inclusions (68). A cette époque elle n'était pathogène au laboratoire que pour l'oeuf de poule embryonné qu'elle tuait lentement en une dizaine de jours mais ne donnait pas d'inclusions en cellules HeLa. Après le 7ème passage sur membrane vitelline la souche a changé ses caractéristiques de croissance : au lieu de tuer les embryons en 10 jours elle les tuait en 4 à 5 jours ; simultanément les inclusions en cellules HeLa sont apparues (138, 139). REEVE et TAVERNE pensent qu'il s'agit d'un mutant adapté à la culture sur cellules. Cette souche, tuant les embryons rapidement, est appelée depuis MRC_4 "fast killing". Elle nous a été adressée en décembre 1969 par le Professeur COLLIER de l'Institut Lister de LONDRES.

Son cycle de croissance a été étudié dans notre laboratoire, en microscopie photonique et en microscopie électronique, par EB, ORFILA et DEVAUCHELLE (40) ; au cours de cette étude des modifications morphologiques et biochimiques de l'inclusion sont apparues sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

2. ENTRETIEN DE LA SOUCHE AU LABORATOIRE.

Cette souche est entretenue au laboratoire par passages successifs sur la membrane vitelline d'oeufs de poule embryonnés âgés de 6 jours.

a- Inoculation à l'oeuf

Les oeufs préalablement incubés à 39° sont mirés afin de vérifier la vitalité des embryons puis placés sur des supports, chambre à air vers le haut. La coquille est soigneusement nettoyée à l'alcool iodé et percée à l'aide d'un poinçon. Une seringue à aiguille fine contenant la suspension infectieuse est introduite verticalement sur une longueur de 2 cm et permet d'injecter 0,2 ml d'une suspension infectieuse de l'agent dans la cavité vitelline.

Les orifices d'inoculation sont à nouveau rapidement essuyés à l'aide d'un coton imprégné d'alcool iodé puis obturés par un petit carré de papier autocollant. Les oeufs ainsi inoculés sont incubés à 35°. Chaque jour la vitalité des embryons est surveillée. Ceux dont la mort survient 24 à 48 heures après l'inoculation sont rejetés. La mort des embryons infectés se produit généralement vers le 3ème-4ème jour.

b- Prélèvement de la membrane vitelline

Les oeufs morts sont placés sur un support. La coquille est nettoyée à l'alcool iodé puis cassée à l'aide de pinces stériles ; la membrane coquillière est enlevée découvrant les membranes chorio-allantoïdienne et vitelline ; cette dernière saisie près du hile est extraite à la pince et vidée du contenu vitellin. Elle est ensuite placée en petits flacons de verre stériles bouchés avec une capsule à joint de caoutchouc et conservée au congélateur à - 30°.

La richesse de la membrane vitelline en particules infectieuses est vérifiée par l'examen de frottis d'un fragment de cette membrane sur une lame de verre ultérieurement colorée selon la méthode de Castañeda (voir paragraphe 4) : les corps élémentaires apparaissent colorés en bleu sur fond rose.

Simultanément une vérification bactériologique est effectuée par ensemencement d'un fragment de membrane sur gélose au sang.

3. PREPARATION DE L'INOCULUM INFECTIEUX DESTINE A L'EXPERIMENTATION.

Nous avons été amené au cours de notre travail à préparer deux types d'inoculum :

a- Inoculum préparé directement à partir de la membrane vitelline :

Les membranes vitellines choisies pour leur richesse en particules infectieuses d'après la coloration de Castañeda sont placées dans un pot de verre de 15 ml contenant une solution de Hanks sur lequel vient s'adapter un obturateur muni de palettes d'acier. Le flacon ainsi monté est placé sur un broyeur-homogénéiseur et les membranes broyées pendant 1 minute. L'émulsion, transvasée dans des pots stériles, est centrifugée pendant 5 mn à 3000 tours. Les débris cellulaires sédimentent et la couche intermédiaire contenant les particules infectieuses est prélevée à l'aide d'une seringue à travers le sur-nageant lipidique. Cette suspension servira à inoculer les cellules.

La suspension infectieuse est titrée sur cellules cultivées en tubes de Leighton selon la méthode de FURNESS, GRAHAM et REEVE (45). Cependant nous n'avons pas effectué le titrage après inoculation directe dans les tubes de Leighton qui donne des résultats peu reproductibles ; nous avons préféré la technique suivante : les lamelles sont extraites des tubes grâce à une pipette Pasteur recourbée à son extrémité et placée à l'aide de pinces stériles sur des chevalets en verre disposés dans des boîtes de Pétri ; ces chevalets reposent sur un papier filtre imprégné de 5 ml de solution saline de Hanks afin d'éviter la dessiccation des cellules. Les lamelles ainsi disposées sont recouvertes de la suspension infectieuse (environ 0,2 ml). Les boîtes de Pétri sont portées à l'étuve à 37° pendant 2 heures. Au bout de ce temps l'inoculum est rejeté, les lamelles sont rincées trois fois à l'aide d'un jet de seringue de solution de Hanks puis remises dans les tubes. Le milieu de culture est alors ajouté à raison de 2 ml par tube. Les lamelles sont prélevées au bout de 24, 48 et 72 h

et colorées au Giemsa (voir paragraphe 4). Pour chacun des prélèvements les inclusions sont comptées au microscope à l'objectif à immersion sur 500 cellules réparties sur toute la surface de la lamelle.

Les résultats de ces titrages effectués dans les conditions que nous venons de décrire étaient irréguliers, toujours très bas, allant de 0,1 % à 10 %. Pour nous la difficulté était encore accrue du fait de l'addition de certains antibiotiques qui suppriment la multiplication de ces agents et rend très longue et laborieuse l'exploration en microscopie électronique.

Aussi avons-nous été amenés à modifier la technique d'inoculation et à adopter une technique sur cellules qui nous a donné régulièrement 20 à 30 % d'inclusions dans les tubes témoins.

b- Utilisation d'un inoculum préparé à partir d'une culture cellulaire :

La suspension infectieuse obtenue à partir des membranes vitellines est inoculée à un flacon de cellules KB. Le milieu d'entretien est vidé, remplacé par la suspension infectieuse et le flacon est mis à incuber pendant 2 heures à 37°. Parallèlement nous avons inoculé des cellules sur lamelles contenues en tubes Leighton qui serviront à déterminer le titre infectieux d'origine.

Après 2 heures de contact l'inoculum est ôté, le tapis cellulaire lavé trois fois avec la solution saline de Hanks puis remis en contact avec le milieu 199 de Parker. Les cellules sont incubées à 37°. Chaque jour une lamelle est prélevée, colorée au Giemsa et les inclusions sont comptées. Au bout de 48 heures le flacon inoculé est trypsiné et réparti en deux flacons et quatre tubes de Leighton dont une lamelle sera prélevée chaque jour jusqu'à la 96^{ème} heure. Toutes les 48 heures une nouvelle trypsination est effectuée et les cellules changées de flacon.

L'évolution du titre infectieux est suivie après comptage des inclusions sur les lamelles. Quand le titre infectieux atteint environ 80 % l'expérience proprement dite est entreprise et l'inoculum préparé. Ce titre est atteint plus ou moins rapidement selon le titre d'origine. Quand l'inoculum de départ donne 0,1 % d'inclusions, 4 ou 5 trypsinations sont nécessaires, alors que 10 % d'inclusions n'en nécessitent que 2 ou 3 au maximum.

Le mécanisme d'action de la trypsine dans ce processus est mal connu. Sans doute cette enzyme a été décrite comme stimulant les mitoses mais ici nous pensons qu'essentiellement son rôle consiste à détacher les cellules de la paroi du flacon et que c'est l'agitation nécessaire à la dissociation des cellules dans le milieu, qui est responsable de l'augmentation du titre infectieux : les contacts sont multipliés entre les cellules non infectées et les particules infectieuses libérées par l'éclatement, dû à l'agitation, des cellules fragilisées contenant des inclusions mûres. C'est ce qui expliquerait aussi la raison pour laquelle le nombre de trypsinations nécessaires dépend du nombre d'inclusions à l'origine.

Les *cellules infectées* sont alors *rompues* par agitation mécanique avec des billes de verre préalablement stérilisées. La suspension de débris cellulaires et de particules infectieuses est centrifugée pendant 5 mn à 3000 tours. Le surnageant contient les particules infectieuses et sert à inoculer les cellules destinées à l'expérimentation.

C. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION.

1. INOCULATION DES CELLULES.

Les flacons destinés à la microscopie électronique et les tubes de

Leighton sont vidés de leur milieu d'entretien. L'inoculum préparé précédemment est réparti à raison de 5 ml par flacon et de 2 ml par tube.

Flacons et tubes sont portés à l'étuve à 37° pendant 24 heures. Au bout de 24 heures, le milieu est changé et remplacé par les dilutions d'antibiotiques.

2. PREPARATION DES DILUTIONS D'ANTIBIOTIQUES.

Les solutions d'antibiotiques sont préparées de façon à obtenir des concentrations croissantes selon une progression arithmétique de raison 10 dont le premier terme est 0,5 ; ce qui nous donne des solutions finales contenant 0,5 - 5 - 50 et 500 µg d'antibiotiques par ml de milieu de culture. Les dilutions sont effectuées dans le milieu nutritif 199 de Parker prêt à l'emploi.

3. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Les lamelles sont prélevées au bout de 24, 48 et 72 heures de contact avec l'antibiotique, soit respectivement 48, 72 et 96 heures après l'inoculation. Elles sont colorées au Giemsa et les inclusions sont comptées afin d'examiner l'influence des antibiotiques sur la dynamique de croissance des agents. Les modifications morphologiques et les anomalies de coloration sont notées.

4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les flacons destinés à la microscopie électronique sont prélevés au bout de 48 heures de contact avec l'antibiotique, soit 72 heures après l'inoculation.

a- Fixation

Les flacons sont vidés de leur milieu et le tapis cellulaire rincé trois fois au tampon phosphate PBS (Phosphate Buffered Saline). La *glutaral-déhyde* en solution à 1,8 % dans un tampon cacodylate à pH = 7. est ajoutée et laissée en contact pendant 1 heure à 4°.

Au bout de ce temps la glutaraldéhyde est jetée et trois rinçages de 5 mn dans le tampon cacodylate sont effectués à 4°.

Les cellules sont alors grattées à l'aide d'une pipette Pasteur portant à son extrémité un petit carré de caoutchouc, mises en suspension dans le tampon cacodylate et centrifugées à 2000 tours/mn pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est récupéré et l'*acide osmique* à 2 % est ajouté et laissé en contact 1 heure à 4°.

b- Déshydratations

Les cellules fixées sont déshydratées dans un gradient d'*acétone* :

- 5 mn dans l'*acétone* 30 %
- 5 mn dans l'*acétone* 50 %
- 5 mn dans l'*acétone* 70 %
- 2 fois 10 mn dans l'*acétone* 95 %
- 3 fois 15 mn dans l'*acétone* absolu.

Pendant les trois premiers temps les cellules sont remises en suspensions dans l'*acétone* afin d'établir un meilleur contact entre le solvant et les cellules à déshydrater, puis centrifugées à 2000 tours pendant 5 mn. Après le passage dans l'*acétone* à 70 % le culot n'est plus dissocié.

c- Inclusion

Les culots cellulaires fixés et déshydratés sont laissés une nuit en contact avec un mélange à parties égales volume/volume de résine et d'acétone pur. Le lendemain les culots sont versés dans des tubes à fond plat contenant de la résine pure et chauffés pendant 1 heure à 37° ; après fragmentation du culot l'inclusion définitive est faite dans la résine pure constituée d'*Epon* et d'*Araldite* selon VOELZ et DWORKIN (1979).

d- Coupe

Les coupes ont été effectuées au couteau de verre sur ultra-microtomes Porter-Blum MT 2 et LKB. Elles ont été recueillies sur membrane de parlodion portée par des grilles de cuivre "200 MESH" de 32 mm de diamètre et contrastées comme il suit :

- *acétate d'uranyle* pendant 20 mn
- rinçage dans l'alcool à 50°
- séchage
- *citrate de Plomb* 10 mn
- rinçage en eau distillée
- séchage

Les examens ont été effectués au microscope électronique RCA EMU 3 D sous une tension d'accélération de 100 KV.

D. REACTIFS ET COLORATIONS.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

a- Coloration de Castañeda :

solution tampon

. Phosphate monopotassique	1	g
. Eau distillée	100	ml
. Phosphate disodique 12 H ₂ O	1	g
. Eau distillée	100	ml

azur de méthylène

. Azur de méthylène	1	g
. Alcool méthylique	100	ml

Préparation du colorant (préparation extemporanée)

. Solution tampon	20	ml
. Formol neutralisé	1	ml
. Colorant	0,15	ml

safranine

. Safranine à 0,2 % dans l'eau distillée	1	Vol.
. Acide acétique à 0,1 %	3	Vol.

Les frottis de membranes vitellines sont colorés avec la solution de Castañeda pendant 2 minutes. Rejeter le colorant et inonder par la solution de Safranine pendant 5 secondes. Rincer à l'eau distillée.

b- Coloration de May-Grünwald-Giemsa :

eau tamponnée pH 7.

. Phosphate monopotassique	1	g
. Phosphate disodique cristallisé	3	g
. Eau distillée q.s.p.	1000	ml

colorants

. Réactif de May-Grünwald	1	ml
. Réactif de Giemsa	2	ml
. Eau tamponnée	17	ml

Les lamelles retirées des tubes de Leighton sont rincées au PBS, fixées 10 mn dans l'alcool méthylique, séchées, puis recouvertes pendant 20 mn par le colorant de Day-Grünwald-Giemsa. Elles sont ensuite abondamment rincées à l'eau tamponnée, séchées puis déshydratées avant d'être montées en Eukitt sur une lame histologique.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

a- Tampon cacodylate pH 7.

. Cacodylate de (PM = 214,05) 0,1 M	2,1405	g
. Sucrose	5	g
. Eau distillée	100	ml

b- Glutaraldéhyde à 1,8 %.

. Glutaraldéhyde 25 %	7,2	ml
. Tampon cacodylate	50	ml
. Sucrose	1,66	g
. Eau distillée	100	ml

c- Acide osmique à 2 % (préparation extemporanée)

. O ₈ O ₄ à 4 % dans l'eau distillée	1	ml
. Tampon cacodylate	1	ml

d- Résine d'inclusion (VOELZ-DWORKIN -179-)

. Araldite	20	ml
. Epikote	25	ml
. DDSA	60	ml
. DOP 30	2	ml

e- Acétate d'uranyle à 2 % (préparation extemporanée)

. Solution mère à 4 % dans l'eau distillée	1	Vol.
. Alcool absolu	1	Vol.

f- Citrate de Plomb (VENABLE -177-)

. Citrate de Plomb	4	mg
. NaOH 10 N	0,2	ml
. Eau distillée	10	ml

CHAPITRE II

- ETUDE DES TEMOINS -

° °
°

Avant de commencer la description des images obtenues après addition des antibiotiques, nous décrirons l'aspect normal des inclusions observées au cours du cycle de croissance de l'agent selon notre protocole expérimental.

Nous insisterons sur trois points :

- l'*inoculum infectieux* est mis en présence des cellules pendant 24 heures avant l'addition des antibiotiques. Ce long temps de contact, pendant lequel l'agent commence à se développer nous place ainsi dans les conditions rencontrées en clinique lors de l'installation d'une thérapeutique.

- en *microscopie photonique*, les prélèvements sont effectués au bout de 24, 48 et 72 heures de contact avec l'antibiotique ce qui correspond dans le cycle normal, à la 48ème, 72ème et 96ème heure de croissance.

- en *microscopie électronique*, ils sont effectués après 48 heures de contact avec l'antibiotique, soit à la 72ème heure du cycle.

Parallèlement, afin de vérifier l'action éventuelle des antibiotiques sur la cellule-hôte elle-même nous avons effectué des témoins cellules non infectées additionnées d'antibiotiques.

A. TEMOINS CELLULES INFECTEES.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Les cellules KB possèdent un noyau finement granuleux, de coloration rose, qui renferme deux ou trois nucléoles bleu-violet intense. Le cytoplasme, dont la surface est relativement faible pour une cellule de type épithélial, présente une structure fine et homogène de coloration bleu-pâle. Dans bon nombre de ces cellules il faut noter la présence de petits corps ronds, finement granuleux, de coloration rose, mesurant environ $2\ \mu\text{m}$ proches du noyau. Ces éléments semblent être des fractions issues du noyau.

A la 48ème heure du cycle nous observons trois types d'inclusions :

- *petites inclusions* de 2 à $4\ \mu\text{m}$ de diamètre, proches du noyau, d'un bleu très foncé, denses, compactes, ne laissant voir aucune structure interne, dont les contours sont ronds ou légèrement irréguliers.

- *inclusions moyennes*, rondes ou ovales, de 6 à $14\ \mu\text{m}$ de diamètre, bleu-foncé également apparaissant quelquefois bosselées. Ce sont ces inclusions qui prédominent.

- *grandes inclusions*, coiffant le noyau tel un chapeau de gendarme qui mesurent environ $14\ \mu\text{m}$ de large sur $30\ \mu\text{m}$ de long et contiennent de nombreuses particules violet-pourpre serrées les unes contre les autres, les corps élémentaires (CE), donnant un aspect granuleux à ces inclusions.

Les trois types d'inclusions dont le stade d'évolution est différent, se rencontrent sur la même lamelle ; il n'est pas rare de voir dans une même cellule deux inclusions de grandeur différente, l'une petite et très bleue, l'autre plus grande et déjà granuleuse, ces deux inclusions provenant certainement de l'évolution de deux particules infectieuses différentes ayant parasité

la même cellule mais dont la multiplication n'a pas commencé en même temps. Ce développement asynchrone a été signalé dans les généralités pour l'ensemble des agents.

Des cellules multiparasitées sont fréquemment rencontrées ; le plus souvent deux ou trois inclusions sont présentes, quelquefois davantage, chacune d'elles situées à proximité du noyau.

A la 72ème heure du cycle, les inclusions ont encore des tailles différentes mais leur aspect interne est plus homogène. Quelle que soit leur taille presque toutes contiennent des corps élémentaires violet-pourpre, serrés mollement les uns contre les autres et se détachant sur le fond de la vacuole dont la teinte apparaît bleue, d'un ton plus soutenu que celui du cytoplasme de la cellule-hôte. Elles sont rondes, ovales ou en chapeau de gendarme coiffant le noyau ; certaines sont très grandes occupant une grande portion de cytoplasme et proviennent sûrement de la fusion de plusieurs inclusions résultant d'un polyparasitisme de la cellule, phénomène qui a été montré en microcinématographie en contraste de phase par LEPINAY et coll. (82). Quelques très rares petites inclusions existent encore.

A la 96ème heure, il existe toujours de nombreuses inclusions de grande taille ou moyenne mais la proportion des très petites inclusions a augmenté, celles-ci résultant vraisemblablement d'un deuxième cycle de l'agent.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

A la 72ème heure du cycle, comme en microscopie photonique, des inclusions de différentes tailles ont pu être observées :

Les plus fréquentes sont grandes ; elles occupent une fraction importante de cytoplasme, ou suivent les contours du noyau qu'elles coiffent. Ces inclusions proviennent le plus souvent de la fusion d'inclusions très proches : la *planche 3* montre nettement la juxtaposition de 4 d'entre elles dont les limites sont encore marquées par des étranglements cytoplasmiques ; à la partie supérieure du cliché une languette de cytoplasme constituée d'une seule mitochondrie étirée vient juste de se rompre. Ces inclusions contiennent les trois types de particules avec une forte proportion de corps élémentaires.

D'autres, de taille moyenne, contiennent soit uniquement des corps initiaux et quelques corps intermédiaires, soit déjà des corps élémentaires.

Quelques unes très petites ne contiennent qu'un corps élémentaire, ou quelques corps initiaux.

Mais ce qui nous a le plus frappé au cours de l'observation de nos témoins, comparativement à la description qui avait été faite de cet agent par EB et coll. (40), c'est la *structure des corps élémentaires*. Que ce soit dans les petites ou les grandes inclusions, ils apparaissent creusés d'une vacuole claire ou grisâtre au sein du cytoplasme bactérien ; deux aspects différents peuvent être décrits :

- certains (*Planche 2*) sont très opaques aux électrons et la vacuole creusée dans leur cytoplasme, de forme circulaire, irrégulière, prend une teinte grisâtre. Quelquefois la vacuole est très claire, tout à fait transparente aux électrons (*Planche 4 - Fig. 1*). Ces différences de teinte sont vraisemblablement dues à l'épaisseur variable des coupes effectuées à l'ultra-microtome.

- mais d'autres fois les vacuoles sont claires, transparentes aux électrons, circulaires le plus souvent, à bords nets et contiennent des petites structures dont les formes rappellent celles de cristaux ou de rosettes (*Planche 3*).

Quelques particules, que l'on qualifierait de corps élémentaires au vu de leur nucléoïde excentré, sont assez grandes : leur taille est proche de celle des corps intermédiaires, voire des corps initiaux (*Planche 2 et Planche 6 - Fig. 2*).

Quant aux *corps initiaux* ils contiennent assez souvent des petits bâtonnets de 0,05 à 0,07 μ m entourés d'une zone plus claire ; ce sont vraisemblablement des filaments d'ADN dont la condensation a été provoquée par la fixation des coupes en microscopie électronique (194), (*Planche 4 - Fig. 2*).

Un autre phénomène plus fréquent est retrouvé au niveau de ces corps initiaux : il s'agit du *bourgeonnement*. Le cytoplasme ondule et forme une ou plusieurs protubérances plus denses aux électrons, qui se resserrent à leur base et s'isolent entre la membrane cytoplasmique et la paroi (*Planche 5 - Fig. 2*). Le nombre de bourgeons est variable. Quelquefois la masse cytoplasmique entière éclate en petits bourgeons (*Planche 6 - Fig. 2*). La formation de ces bourgeons a déjà été montrée par EB et coll. sur l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (39). Ce phénomène avait été envisagé comme un mode de reproduction possible. S'il en était ainsi, les deux modes de reproduction pourraient être simultanés comme le montre la *Fig. 2* de la *Planche 5* : l'une des cellules-filles provenant de la fission binaire d'un corps initial présente en effet trois bourgeons en formation.

La paroi toute seule peut aussi onduler, émettre une sorte de pseudopode dont la striction à la base entraîne vraisemblablement la formation des figures membranaires circulaires trouvées en assez grand nombre à l'intérieur des inclusions (*Planche 6 - Fig. 1*). L'expulsion simultanée d'un bourgeon cytoplasmique et d'un fragment de paroi pourra conduire à la formation des petites particules d'aspect analogue à celui des corps initiaux mais dont la taille n'excède pas 0,2 μ m et qui sont très souvent rencontrées chez les Chlamydiae (166).

Il existe assez fréquemment à l'intérieur des grandes inclusions des figures myéliniques de petite taille dont nous ne connaissons pas la signification (*Planche 4 - Fig. 2*) ; peut-être s'agit-il de la destruction de certains corps à l'intérieur même de l'inclusion ?

Les mitochondries sont toujours présentes en grand nombre autour des inclusions. Certaines sont allongées, étirées, véritablement accolées à l'inclusion réalisant une image en haltères (*Planche 5 - Fig. 1*) ; les crêtes mitochondriales forment des feuilletts superposés qui épousent parfaitement la forme de l'inclusion. Ces observations s'accordent avec les travaux de MOULDER et de WEISS qui signalent la dépendance énergétique des Chlamydiae vis-à-vis de leur cellule-hôte (116, 186, 192).

Nous avons aussi de nombreuses fois remarqué la présence de lamelles de réticulum endoplasmique ou lamelles annelées auprès de très petites inclusions (*Planche 6 - Fig. 2*). D'autre part en recherchant ces petites inclusions nous avons pu observer des figures myéliniques, petites vacuoles de phagocytose, serties d'un grand nombre de feuilletts opaques aux électrons, dont l'image évoque celle de lysosomes secondaires et contenant une particule qu'il est difficile d'identifier : les membranes sont altérées et la structure interne est filamenteuse et désorganisée (*Planche 6 - Fig. 3*). De telles images ont été déjà signalées par FRIIS (44) ; cet auteur pense qu'il s'agit de corps élémentaires non infectieux digérés par les enzymes des lysosomes de l'hôte.

3. DISCUSSION.

Le cycle de croissance de cette souche ainsi que son aspect ultrastructural ont déjà été étudiés dans notre laboratoire par EB et coll. (40), comme nous l'avons signalé précédemment. Deux observations particulières portant sur la morphologie des inclusions et leur contenu en glycogène ont été notées pendant l'étude de cette souche :

- Au début de l'étude les inclusions se caractérisaient par l'apparition d'une petite vacuole qui augmentait de taille et renfermait à la 24ème heure quelques corps initiaux ; cette vacuole grandissait et contenait à la 48ème heure de nombreux corpuscules violet-pourpre largement dispersés à l'intérieur ; ces inclusions étaient dites de type clairsemé. Des colorations cytochimiques à l'iode et au PAS effectuées sur les cellules, révélaient la présence à l'intérieur des inclusions, d'un polysaccharide ayant les caractéristiques du glycogène. La réaction était maximum, en intensité et en nombre, à la 48ème heure. Ce glycogène pouvait d'ailleurs être mis en évidence sur les coupes de microscopie électronique où il apparaissait sous forme de rosettes à l'intérieur de l'inclusion.

Cette étude fut renouvelée plus tard et les auteurs eurent la surprise de constater que l'aspect des inclusions était différent. Dès la 12ème heure ils pouvaient observer dans le cytoplasme, non plus une vacuole claire mais une petite formation arrondie, colorée en bleu au Giemsa, qui prenait un aspect mûriforme vers la 18ème heure, la *morula* ; jusqu'à la 24ème heure cette inclusion, dense, compacte, toujours colorée en bleue, se remplissait de corps initiaux serrés les uns contre les autres. A la 48ème heure, de nombreux corps élémentaires colorés en violet se mêlaient aux corps initiaux donnant à l'inclusion un aspect granuleux. Quant aux colorations à l'iode, elles étaient négatives pour l'ensemble de ces inclusions.

Ainsi la *morphologie des inclusions s'était transformée, passant d'un type clairsemé, glycogène positif, à un type dense et compact, glycogène négatif.* L'influence de différents facteurs a été examinée sans qu'il soit possible d'en tirer des conclusions. A l'heure actuelle c'est toujours ce type d'inclusions que nous observons (*Planche 1 - Fig. 1*).

En microscopie électronique, le cycle de croissance était le même quel que soit le type d'inclusions et identique à celui qui a été décrit dans les généralités ; seuls différaient la présence des rosettes de glycogène et le nombre des particules, celui-ci étant inférieur dans les inclusions de type clair-semé.

Quant aux corps élémentaires ils étaient tels qu'on les décrit classiquement, avec leur nucléoïde excentré situé dans un cytoplasme riche en ribosomes mais sans aucune vacuole visible, les coupes de ces corps étant très denses aux électrons.

Pour expliquer l'aspect des corps élémentaires trouvés à l'examen de nos coupes nous avons envisagé plusieurs hypothèses :

1° L'existence d'un *artefact* dû aux méthodes de préparation utilisées en microscopie électronique.

Toutefois aucune structure anormale n'a été observée dans la cellule-hôte et il nous paraît peu probable que seuls les corps élémentaires aient été sélectivement touchés. Notons cependant que de tels corps sont présents sur les images de microscopie électronique de FRIIS décrivant l'entrée de Chlamydia psittaci dans les cellules L, les inclusions ayant été préparées en araldite seule (44).

2° Les *trypsinations successives* utilisées en vue d'augmenter le titre infectieux de notre inoculum sur cellules.

Nous nous sommes demandés si la trypsine, enzyme protéolytique, n'aurait pas eu une action lytique sur certains constituants des corps élémentaires. Dans la mesure du possible nous avons essayé d'éliminer les débris cellulaires et cellules infectées non rompues par l'agitation mécanique, pour ne conserver que le surnageant chargé de particules infectieuses. De telles particules, parasitant les cellules mises en expérience, évoluent selon le cycle

de l'agent vers de nouveaux corps élémentaires, lesquels n'ont jamais été en contact avec la trypsine. Il faut toutefois envisager qu'une cellule parasitée provenant de l'inoculum ait pu rester dans le surnageant ; mais la trypsine n'étant que peu de temps au contact de nos cellules, il est peu probable qu'elle ait pu pénétrer au sein de l'inclusion pour y extraire des constituants protéiques, sans exercer une action destructrice sur le cytoplasme de la cellule-hôte. Or les cellules KB observées ne présentent pas d'anomalies. Aussi nous pensons que la trypsine n'a aucun rôle dans l'apparition de ces structures et qu'une autre explication doit être donnée.

3° Une *modification métabolique* ou *structurale*.

Ces vacuoles n'apparaissant que dans les corps élémentaires c'est-à-dire à la fin du cycle évolutif et des processus métaboliques, elles pourraient résulter de la disparition d'un constituant métabolique. La nature de ce constituant reste à préciser. La présence de glycogène à cet emplacement a été démontrée chez Chlamydia psittaci (83) et chez Chlamydia trachomatis, souche BEDSON de lymphogranulomatose vénérienne (40). Or, bien que classiquement décrite comme contenant du glycogène, notre souche MRC₄ a perdu cette faculté pour des raisons que nous ignorons. Il est tentant de conclure que ces vacuoles vides étaient le lieu de stockage du glycogène, puisque cette souche au départ glycogène positif ne présentait pas cette anomalie. Des études métaboliques et histo-chimiques restent à faire pour préciser ces notions. A moins qu'il ne s'agisse d'une mutation, les pertes de caractères biochimiques étant fréquemment constatées dans les souches de collection.

Quant aux nombreuses formations membranaires circulaires trouvées à l'intérieur des inclusions elles ont été décrites chez les Chlamydiae par d'autres auteurs notamment LEPINAY (Thèse de Sciences -1971-) qui ont montré aussi

leur formation à partir de la paroi. D'autres bactéries à Gram négatif présentent aussi ce phénomène ; CHATTERJEE et DAS l'ont signalé chez Vibrio cholerae (26), DEVOE et GILCHRIST chez Neisseria meningitidis (36). Ces vésicules semblent ne se produire que lors de la phase exponentielle de croissance des bactéries et pas pendant leur phase stationnaire et il est intéressant de noter que chez les Chlamydiae ce phénomène n'a pu être décrit que dans les corps initiaux qui représentent la forme active de multiplication. Sachant que la paroi des bactéries à Gram négatif est le support et la localisation de l'endotoxine lipopolysaccharidique ce phénomène représente peut-être le processus actif in vivo de formation de la toxine des Chlamydiae. Mais il ne faut pas oublier que ces excroissances membranaires peuvent aussi être un artefact de microscopie électronique provoqué lors de la fixation par l'action des fixateurs sur la paroi.

B. TEMOINS CELLULES NON INFECTÉES ADDITIONNÉES D'ANTIBIOTIQUES.

Les cellules KB non infectées ont été additionnées des différentes dilutions d'antibiotiques dans les mêmes conditions que celles de l'expérience. Peu de conclusions peuvent être tirées à la suite de leur observation :

- En présence de 500 µg/ml de rifamycine SV les cellules se sont décollées et le peu qui restait dans les flacons contenant 50 µg/ml n'a pas résisté aux manipulations de microscopie électronique. Les autres dilutions n'ont pas entraîné de modifications.

- Les cellules qui sont restées en contact de 500 µg/ml de chloramphénicol présentaient un cytoplasme très désorganisé, creusé de nombreuses vacuoles alors que dans les dilutions inférieures l'aspect était normal.

- Pour ce qui est des autres antibiotiques, il n'existe apparemment pas de modifications. Toutefois le nombre des clichés que nous avons observés n'était peut-être pas statistiquement suffisant.

CHAPITRE III

- SULFAFURAZOLE -

o o
□

De nombreux travaux de pharmacologie entrepris vers 1930 aboutirent à la découverte d'une substance antibactérienne simple, le sulfanilamide, qui amènera l'essor de la sulfamidothérapie (*Fig. 1*). Il sera vite démontré que toute modification structurale de la molécule altère l'activité antimicrobienne tandis que la fixation de certains radicaux sur l'azote du groupe SO_2NH_2 peut exalter cette activité ou modifier favorablement les propriétés pharmacologiques. De 1936 à 1955 des milliers de dérivés furent synthétisés dont une trentaine seulement furent appelés à jouer un rôle en thérapeutique. Entre autres la sulfadiazine (*Fig. 2*) qui reste l'étalon servant à évaluer l'activité antimicrobienne de tout nouveau sulfamide, et le sulfafurazole (*Fig. 3*) dont la solubilité est satisfaisante.

Dès 1940, WOODS avait signalé que l'effet bactériostatique des sulfamides était réversé par l'acide para-aminobenzoïque, démontrant ainsi l'importance biologique de ce composé (*Fig. 4*). Plus tard, il a été reconnu que cet acide était un constituant essentiel de la molécule d'acide folique (*Fig. 5*) et il semble maintenant tout à fait probable que la seule fonction métabolique du para-aminobenzoate est de servir de précurseur pour la biosynthèse des composés de l'acide folique.



Fig. 1

SULFANILAMIDE

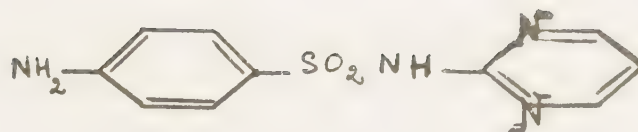


Fig. 2

SULFADIAZINE

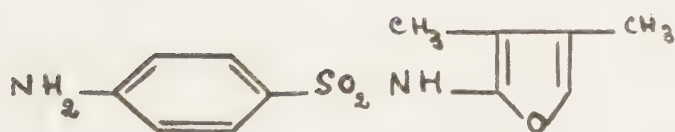


Fig. 3

SULFAFURAZOLE



Fig. 4

ACIDE

p. AMINO-BENZOIQUE

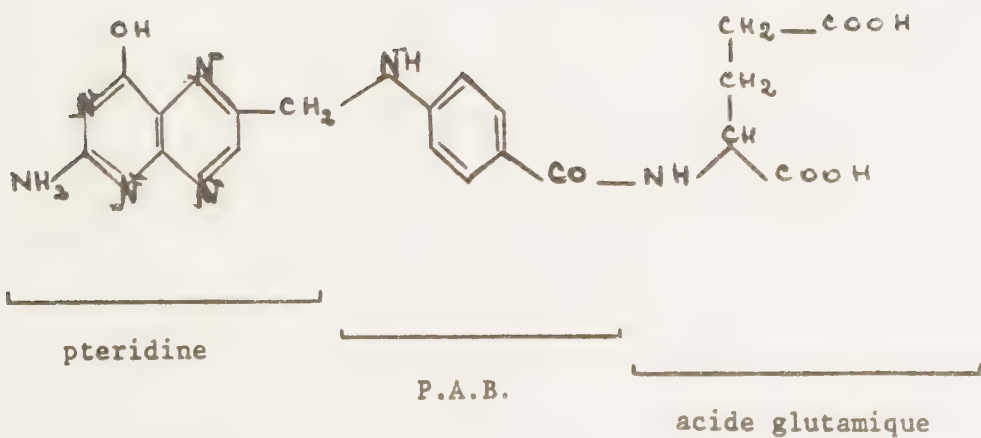
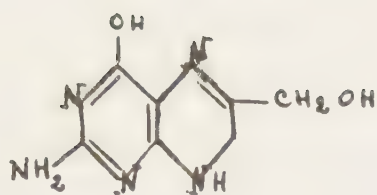


Fig. 5

ACIDE FOLIQUE



2-amino. 4-hydroxy

6-hydroxymethyl dihy-

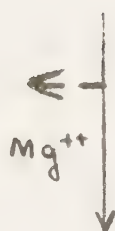
dropteridine

+

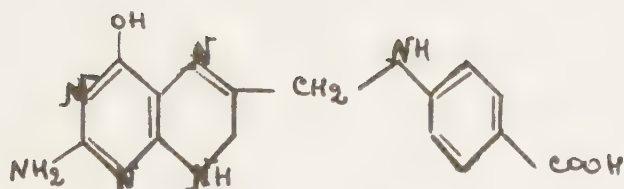


acide p. amino benzoïque

= p. AB

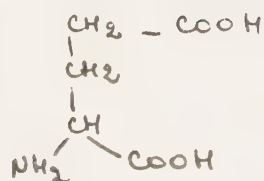


Site d'inhibition
des sulfamides

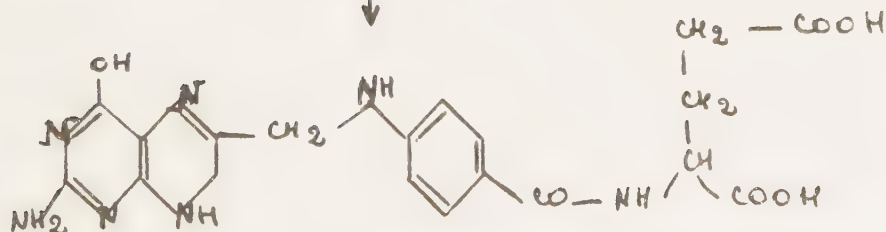


acide dihydropteroïque

+



Acide glutamique



Acide dihydrofolique

Schéma 2

BIOSYNTHESE DE L'ACIDE FOLIQUE

Les *sulfamides* assurent la bactériostase, après pénétration dans le corps microbien, en se *substituant* à l'*acide para-aminobenzoïque* dont ils sont des analogues structuraux (61). Ils seront donc actifs sur les très nombreuses bactéries pour lesquelles l'acide folique endogène est indispensable c'est-à-dire celles qui réalisent leur propre synthèse d'acide folique.

La biosynthèse des coenzymes à acide folique par les organismes autotrophes comprend la formation de l'*acide para-aminobenzoïque* et du groupement ptéridine, leur liaison, puis celle d'une ou plusieurs molécules d'acide glutamique (*schéma 2*). La majorité des microorganismes synthétisent l'*acide para-aminobenzoïque* de novo à partir du phospho-enol-pyruvate et de l'érythrose 4-phosphate bien qu'un certain nombre de souches l'exige de sources exogènes. Quant au groupement ptéridine il provient de la transformation des purines.

Ainsi les organismes pour lesquels l'acide folique ne constitue pas une vitamine sont capables d'en réaliser la synthèse ; ils seront donc sensibles à l'action des sulfamides qui bloquent compétitivement la fixation de l'*acide para-aminobenzoïque* sur le groupe ptéridine. Les composés ainsi formés seront inactifs du point de vue biologique entraînant une carence en acide folique (23).

L'*acide folique* dont les formes métaboliquement actives sont les dérivés d'oxydo-réduction (*schéma 3*) est un *transporteur de carbone* utilisé dans plusieurs voies métaboliques importantes (*schéma 4*) (62) :

- au cours de la biosynthèse des bases puriques, le N_{10} -formyl THF fournit les 2ème et 8ème atomes de carbone.

- le N_5-N_{10} méthylène THF donne le radical méthyl utilisé dans la transformation de l'*acide désoxyuridylique* en *acide thymidylique*, indispensable à la synthèse de l'ADN.

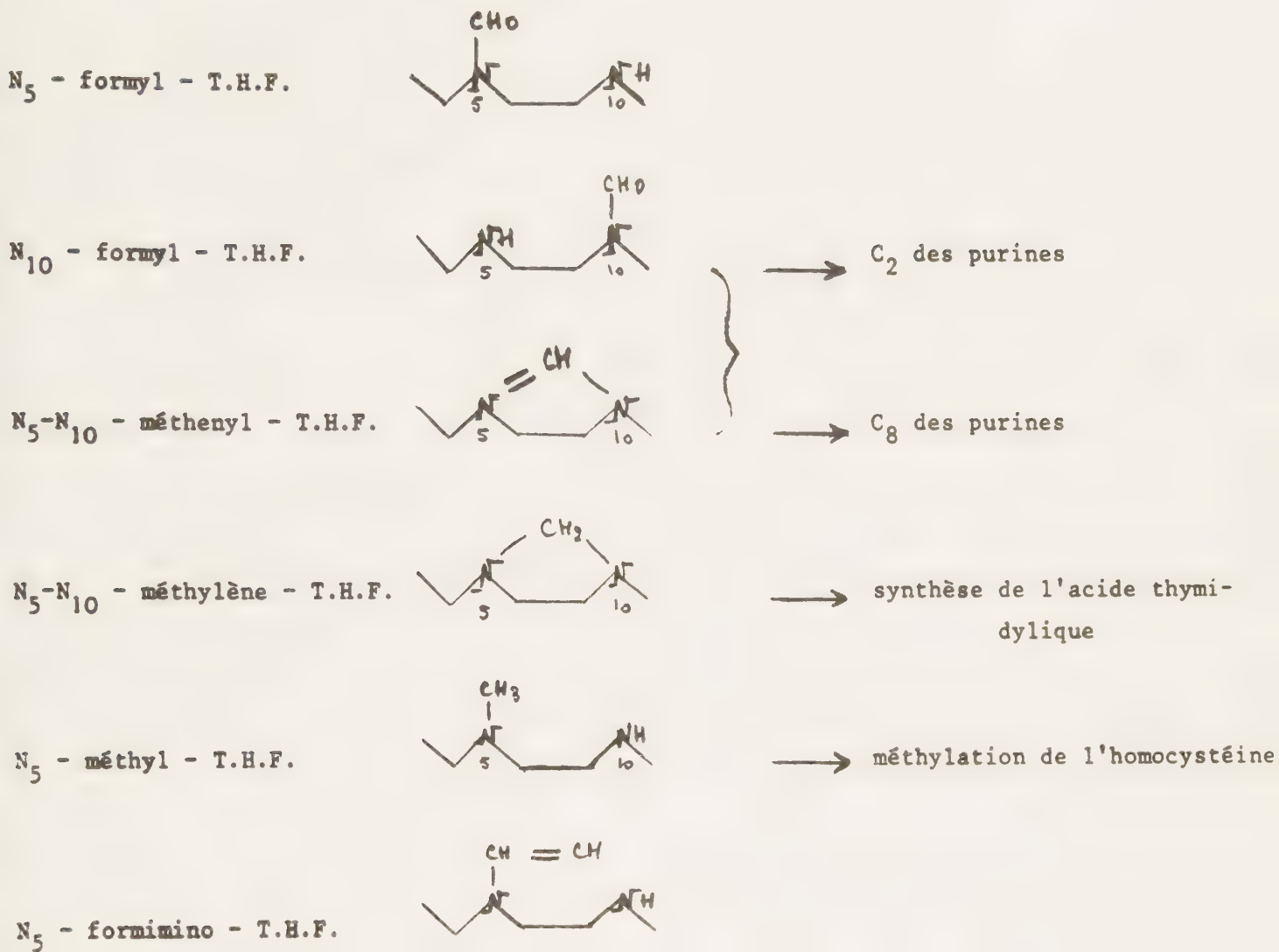
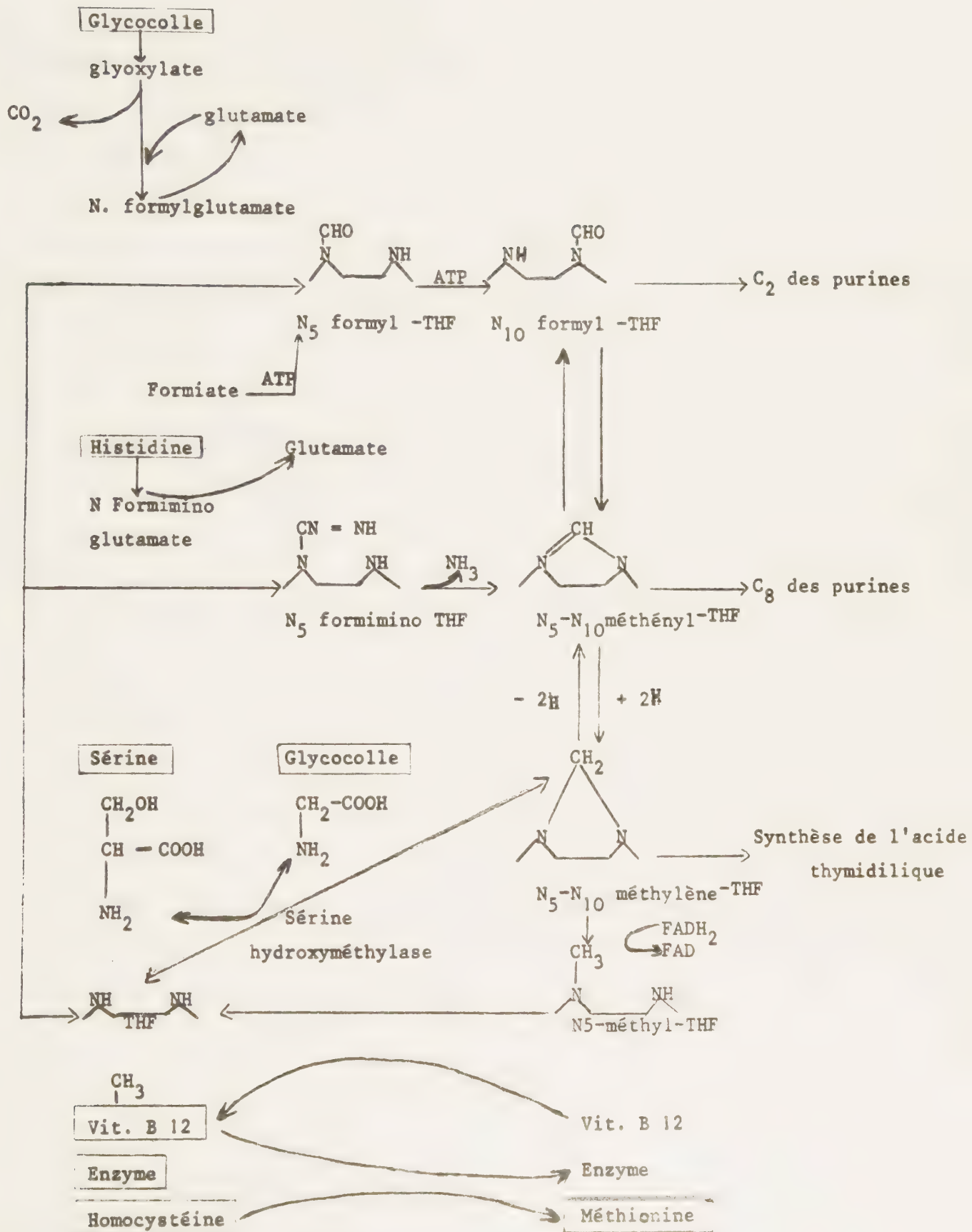


Schéma 3

DERIVES FORMYLES DE L'ACIDE TETRAHYDROFOLIQUE



- il intervient aussi dans le métabolisme des acides aminés. Le THF agit comme coenzyme dans l'interconversion de la sérine en glycocolle et le N₅méthyl THF apporte le groupe méthyle au cours de la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine. Il intervient également dans le métabolisme de l'histidine où il joue le rôle d'accepteur du groupement formimino lors de la transformation du formiminoglutamate en acide glutamique.

Il joue un rôle également dans l'initiation de la synthèse des protéines où le N₁₀méthyl THF apporte le radical formyl nécessaire à la formylation de la méthionine, premier acide aminé des chaînes polypeptidiques.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Le sulfamide ayant été ajouté 24 heures après le début de l'infection cellulaire afin de laisser à l'agent infectieux le temps de se multiplier, l'étude en microscopie photonique commence à la 48ème heure du cycle. Après 24 heures de contact avec le sulfafurazole les cellules ayant reçu 0,5 et 5 µg par ml sont tout à fait comparables aux témoins, aucune modification n'est visible. Par contre en présence de 50 µg par ml, quelques rares inclusions contiennent un corps rond, bleu presque noir, plus gros que les autres, se détachant au-dessus des granules qui l'entourent. L'examen des cellules cultivées avec 500 µg par ml, ne montre que très peu de grandes inclusions. Les plus nombreuses sont des petites morulae, bleues et les cellules sont fréquemment multiparasitées. Quelques grandes inclusions existent pourtant dans lesquelles on aperçoit deux ou trois corps bleu-foncé au milieu des corps élémentaires punctiformes.

72 heures après le début de l'infection soit après 48 heures de contact avec le sulfafurazole, les inclusions évoluant dans les milieux de culture renfermant 0,5 et 5 μg par ml de sulfamide sont toujours identiques aux témoins et les rares modifications observées en présence de 50 μg par ml sont les mêmes que précédemment : corps bleu-noir dont la taille élevée et la teinte tranchent sur les autres particules. Par contre lors de l'observation de la dilution à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ les proportions s'inversent : il existe bien des inclusions normales, mais leur nombre est faible, et la majorité des inclusions renferme des *particules boursoufflées* : ces corps sont très apparents à l'intérieur de l'inclusion et on pourrait presque les compter (*Planche 11 - Fig. 2 et 3*) ; nettement augmentés de taille, ils sont 3 à 4 fois plus gros que les particules habituellement observées et de teinte variable : les uns apparaissent bleu-pâle tandis que les autres sont violet-rose.

Les lamelles prélevées à la 96^{ème} heure du cycle, c'est-à-dire après 72 heures de contact avec le sulfafurazole, ont les mêmes caractéristiques qu'aux temps précédents : pas de modifications dans les dilutions à 0,5 et 5 μg par ml, très peu de modification à 50 μg par ml, alors que les corps présents dans les dilutions à 500 μg par ml montrent un gigantisme encore plus prononcé.

Le pourcentage d'infection cellulaire a pu être déterminé après comptage des inclusions présentes sur les différentes lamelles ; la moyenne a été établie sur 500 cellules. Les résultats sont les suivants :

SULFAFURAZOLE	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H*	48 H*	72 H*
TEMOIN	13 %	31 %	15 %
0,5 µg/ml	19 %	23 %	10 %
5 µg/ml	13 %	16 %	33 %
50 µg/ml	13 %	20 %	24 %
500 µg/ml	6 %	20 %	27 %

* Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.

La structure de ces inclusions a été approfondie grâce à l'observation en microscopie électronique des différents échantillons prélevés à la 72ème heure du cycle, soit rappelons-le après 48 heures de contact avec le sulfamide.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'ensemble des inclusions observées dans les dilutions à 0,5 et 5 µg par ml de sulfafurazole ne montre pas de modifications par rapport aux témoins. Ces inclusions de taille variable sont quasiment normales. Les trois types de particules sont présents : quelques corps géants apparaissent çà et là à une fréquence guère plus importante que dans les témoins ; il en est de même des petites vésicules membranaires transparentes aux électrons et des figures myéliniques intérieures aux inclusions, déjà signalées dans les témoins (*Planche 7*). Toutefois sur certains clichés (*Planche 8 - Fig. 1*) les feuilletés des figures myéliniques sont plus épais et très denses aux électrons encerclant ce qui semble être un corps élémentaire recroquevillé, difficile à identifier. Certains corps sont anormaux ; l'un d'entre eux (*Planche 7 - Fig. 2*) que l'on peut qualifier de corps intermédiaire laisse apparaître, outre le nucléide, deux plages

grisâtres, finement granuleuses, dont l'une se détache nettement au centre d'une vacuole claire et qui est probablement identique aux vacuoles décrites dans les corps élémentaires des témoins ; la paroi de ce corps est intacte tandis qu'à l'intérieur le cytoplasme se fissure, amorçant une division. Des inclusions de petite taille ne contiennent que des corps initiaux dont les parois, très lâches et ondulantes, sont décollées du cytoplasme (*Planche 8 - Fig. 3*).

Par contre le *bourgeonnement* du cytoplasme bactérien s'accroît lors de la croissance du germe en présence de $50 \mu\text{g}$ par ml de sulfamide. Les corps élémentaires ne sont toujours pas modifiés alors que la plupart des corps initiaux, augmentés de taille, se creusent et se vacuolisent (*Planche 9*) ; leur cytoplasme bourgeonne très intensément (*Planche 10 - Fig. 2*) ou se fractionne en languettes (*Planche 10 - Fig. 1*) ou en mottes dont certaines sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques (*Planche 9*). Toutefois bon nombre d'entre eux sont parfaitement normaux et il faut examiner la dilution à $500 \mu\text{g}$ par ml pour avoir d'emblée l'impression que les inclusions sont anormales. La plupart des inclusions ne contiennent que des *corps initiaux géants* dont la taille moyenne se situe aux environs de $2 \mu\text{m}$: leur forme est irrégulière et les parois, très déformables et ondulantes, sont souvent largement décollées du cytoplasme et paraissent dédoublées. Le cytoplasme de ces corps est tourmenté et de nombreuses petites mottes cytoplasmiques sont éparpillées dans l'inclusion. Des figures en "anse de panier" apparaissent dans le cytoplasme de quelques corps initiaux de petite taille (*Planche 11 - Fig. 1*). Dans certaines inclusions on peut noter l'accumulation, à proximité des corps géants de systèmes membranaires (*Planche 12*).

D'autres inclusions, de grande taille, renfermant des corps élémentaires normaux, mais là encore les corps initiaux sont perturbés (*Planche 13 - Fig. 2*) la paroi est toujours décollée de la membrane cytoplasmique et certains corps en paraissent même dépourvus : tel, ce corps initial en division binaire, dont



l'une des cellules-filles bourgeonne et semble dépourvue de paroi sur l'une de ses faces. Sont également visibles à l'intérieur de cette inclusion de grandes silhouettes membranaires entourant les fantômes d'un corps lysé.

Certaines inclusions ne contiennent même qu'un seul corps initial géant au cytoplasme monstrueux (*Planche 13 - Fig. 1*).

3. DISCUSSION.

La détermination du titre infectieux sur chacune des lames en microscopie photonique montre que, d'après nos conditions expérimentales, la multiplication des germes n'est pas spectaculairement inhibée : après 24 et 48 heures de contact avec le sulfafurazole le nombre d'inclusions est sensiblement le même dans les tubes de réaction et dans les tubes témoins ; sauf toutefois en ce qui concerne les cellules ayant évolué en présence de 500 μg par ml de sulfamide où le nombre d'inclusions après 24 heures de contact est de 6 %, ce qui représente la moitié du pourcentage trouvé dans les cellules témoins au même temps. Par contre cette même dilution de 500 μg par ml laisse, après 72 heures de contact avec l'agent, 27 % d'inclusions, soit le double du chiffre trouvé dans les tubes témoins : il en est de même pour les dilutions à 5 et 50 μg par ml alors que les tubes contenant 0,5 μg par ml se comportent comme les témoins.

La chute du pourcentage d'inclusions entre la 72ème heure et la 96ème heure du cycle de l'agent, passant de 31 % à 15 % correspond à la destruction de cellules parasitées que les inclusions arrivées à maturité ont fait éclater, ce temps de 72 heures représentant la durée moyenne du cycle de l'agent. Mais les autres pourcentages sont pratiquement les mêmes dans les tubes de réaction et dans les tubes témoins, avec toutefois un décalage de 24 heures, ce qui nous amène à penser qu'il y a simplement eu *ralentissement de la croissance du germe* et que toutes les inclusions présentes lors de l'addition du sulfafurazole ont continué à évoluer. Ce ralentissement de l'évolution et de la maturation des



inclusions, très net dans la dilution à 500 μg par ml, est responsable du phénomène de polyparasitisme des cellules qui ressort de l'observation de ces lames nous pensons en effet que, dans ces conditions, la fusion d'inclusions très proches provenant de l'infection simultanée d'une même cellule par plusieurs corps élémentaires ne peut se faire. Ainsi la *figure 3* de la *planche 11* montre la juxtaposition de trois inclusions, dont deux ne renferment qu'un seul corps géant anormal ; il est vraisemblable que la multiplication des particules infectieuses, en l'absence d'inhibiteur, aurait entraîné une augmentation de taille de chacune de ces inclusions qui auraient fini par fusionner en une seule grande inclusion coiffant le noyau.

Ces corps géants que nous venons de signaler, souvent mêlés à des particules normales aux faibles dilutions ou constituant l'essentiel de la population bactérienne en présence de 500 μg de sulfamide, se colorent en bleu au Giemsa, indiquant un *contenu prépondérant en ARN*.

En microscopie électronique, les anomalies résident essentiellement dans la taille et dans l'aspect du cytoplasme : ce sont des corps initiaux géants, de 2 μm de diamètre en moyenne, dont le cytoplasme bourgeonne facilement ou se vacuolise. Les inclusions ayant évolué en présence de 500 μg par ml de sulfafurazole contiennent une forte majorité de ces corps et très peu ou pas de corps élémentaires, ce qui indique un *blocage de maturation* des particules.

L'arrêt de la maturation peut être expliqué de la manière suivante : les sulfamides bloquent la synthèse de l'acide folique des bactéries et cette carence perturbe plusieurs voies métaboliques, en particulier la biosynthèse de l'ADN. Bien que les coenzymes à acide folique interviennent dans la synthèse des bases puriques (62) nous ne pensons pas que cette voie soit en cause chez les *Chlamydiae* car nous avons vu que ces germes utilisaient pour leurs propres synthèses les bases puriques provenant du pool de la cellule-hôte (173). Or les



sulfamides n'ayant pas d'action sur les cellules de mammifères pour lesquelles l'acide folique est une vitamine, ces bases puriques resteront donc disponibles. Par contre la synthèse de l'acide thymidylique, nucléoside monophosphate de la thymine, est une voie essentielle du métabolisme des Chlamydiae car ces agents ne possèdent pas de thymidine-kinase et ne peuvent donc pas utiliser la thymidine du pool de la cellule-hôte ; ils doivent synthétiser leur acide thymidylique à partir de l'acide désoxyuridylique selon le schéma : uridine $\rightarrow$ uridine monophosphate $\rightarrow$ acide désoxyuridylique $\rightarrow$ acide thymidylique. Or le passage de l'acide désoxyuridylique à l'acide thymidylique se fait grâce à la fixation d'un radical méthyle apporté par un coenzyme à acide folique (schéma 5).

La carence en acide folique va donc bloquer la synthèse de l'ADN en supprimant l'apport d'une des bases pyrimidiques, ce qui explique le gigantisme des corps initiaux. En effet la réplication des molécules-filles ne peut s'effectuer et la synthèse de l'ADN est bloquée. Cependant la synthèse des ARN se poursuit, entraînant leur accumulation à l'intérieur de la particule qui augmente de taille ; ce processus explique la teinte bleue, caractéristique des ARN, que prennent ces corps après coloration au Giemsa.

Les coenzymes à acide folique intervenant dans d'autres chaînes métaboliques, il est probable que leur carence entraîne une perturbation de ces métabolismes probablement moins apparente que celle décrite précédemment.

D'autre part nous avons constaté que les modifications morphologiques n'étaient obtenues qu'avec des doses élevées de sulfafurazole : 0,5 μ g par ml n'ont aucune action, 5 μ g par ml semblent retarder l'évolution des inclusions puisqu'à la 96ème heure on a deux fois plus d'inclusions dans ces tubes que dans les témoins mais aucune modification structurale n'a pu être décelée ; les premières apparaissent avec 50 μ g par ml de sulfafurazole et ne deviennent évidentes qu'avec 500 μ g par ml.



Plusieurs explications peuvent être envisagées :

- l'atteinte des agents au sein du cytoplasme de la cellule-hôte nécessite la pénétration des substances antimicrobiennes à travers les parois cellulaires. Une grande partie des sulfamides se fixe sur les protéines, les albumines en particulier, et devient ainsi non mobilisable : seules les fractions libres sont actives et capables de franchir les parois cellulaires. Les milieux de culture étant riches en protéines il est vraisemblable qu'une fraction importante de sulfamide est fixée et que les doses nécessaires à l'inactivation du germe sont par conséquent plus élevées que dans le cas de bactéries indépendantes.

Mais nous pensons que ce sont plutôt nos conditions expérimentales qui sont à incriminer. En effet le sulfafurazole a été ajouté 24 heures après le début de l'infection ; à ce moment là, la plupart des germes sont en phase active de croissance et de nombreux corps initiaux se sont déjà multipliés puisque leur reproduction commence vers la 8ème heure du cycle ; leur temps de génération étant de 2 heures (1), à la 24ème heure leur nombre est déjà important. Si l'on se reporte à la courbe représentant la dynamique de la synthèse de l'ADN établie par BECKER (15) on constate qu'à la 24ème heure la moitié de la totalité de l'ADN synthétisé en fin de cycle est déjà présente. Par conséquent la quantité de molécules d'ADN de l'agent responsables de l'information nécessaire à la synthèse des coenzymes foliques représente une masse importante que les doses faibles de sulfamide seront impuissantes à contrôler alors que les doses fortes pourront les inhiber.

Mais il est probable que le sulfamide à doses moins fortes, administré de façon prolongée inhibera les synthèses qui pourront avoir lieu lors d'un deuxième cycle ou d'autres cycles ultérieurs si quelques particules échappent à son action. Signalons qu'en cultures cellulaires, dans une expérience semblable,



GORDON et QUAN (55) estiment que 20 μ g par ml de sulfadiazine constituent une dose suffisante pour inhiber une souche très proche, le MRC₁ (72).

D'autres expériences sont en accord avec ces résultats. TANAMI et coll. (165) en ajoutant du 5-fluoro 2'-désoxyuridine, — pyrimidine fluorée dont la présence empêche la conversion de l'acide désoxyuridylique en acide thymidylique et bloque par conséquent la synthèse de l'ADN -- constatent que cette substance est sans action sur l'agent de la psittacose lorsqu'elle est ajoutée 23 heures après le début de l'infection alors qu'avant et même jusqu'à la 10ème heure, elle inhibe totalement sa multiplication.

BARKER (7), travaillant dans des conditions identiques aux nôtres, c'est-à-dire avec des cellules de reins de singe infectées depuis trois jours par l'agent du trachome, doit les traiter avec du sulfisoxazole pendant plus de 14 jours pour que disparaisse l'effet cytopathogène dû à l'agent.

Des conclusions thérapeutiques peuvent être tirées de ces résultats. Le traitement du trachome par les sulfamides devra être suffisamment long non seulement pour stériliser les lésions locales, empêcher l'évolution et la maturation des particules présentes dans les nombreuses inclusions des cellules épithéliales mais aussi pour inhiber les particules qui échappent à l'action des sulfamides dans un premier temps et continuent à évoluer (21, 66, 107). Cependant des échecs thérapeutiques ont été constatés (153). Des souches initialement sensibles peuvent devenir résistantes (67) et persister, nécessitant l'intervention d'autres substances chimiothérapeutiques.



CHAPITRE IV

- SYNTHÈSE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES -

° °
°

Elle se fait dans le cytoplasme bactérien sous la direction de l'ADN (91). La structure des gènes du chromosome est transcrite en nombreux exemplaires sous forme d'acide ribonucléique messager (m. ARN). La lecture de ce message sera effectuée au niveau des ribosomes et déterminera la structure primaire de la protéine.

Le transfert d'information de l'ADN aux protéines comporte donc deux étapes :

- la *transcription* de l'ADN chromosomique en ARN messager, assurée par une enzyme, l'ARN-polymérase, qui assemble les ribonucléotides. Cette étape sera inhibée par les *rifamycines*.

- la *traduction* du message qui est effectuée par les ribosomes. De nombreux inhibiteurs sont capables d'entraver cette lecture (184) : les uns se fixent sur la sous-unité 50 S, tels le *chloramphénicol* ; les autres sur la sous-unité 30 S, tels les aminosides, *gentamicine*, *streptomycine*.



I. LES RIFAMYCINES.

Les rifamycines ont été découvertes en 1959 en Italie à partir des bouillons de fermentation du Streptomyces mediterranei (141, 152). Le principal produit de fermentation obtenu dans certaines conditions est la rifamycine B, sans activité antibactérienne mais qui peut facilement être dégradée en un composé actif, la rifamycine S. Dès 1962 les rifamycines ont été utilisées en clinique, dans le traitement de la tuberculose, par voie parentérale car les produits naturels n'ont pas d'activité par voie orale.

Leur structure chimique fut déterminée en 1963 (*Fig. 6*) ; un chromophore naphtoquinonique porte une chaîne aliphatique reliée à ses deux extrémités d'une part à l'N porté par le C en 2, d'autre part à l'O porté par le C 12, ce qui réalise une "anse" au-dessus du chromophore. Une nouvelle ère commençait avec la possibilité d'obtenir des dérivés semi-synthétiques parmi lesquels deux nous intéressent ici :

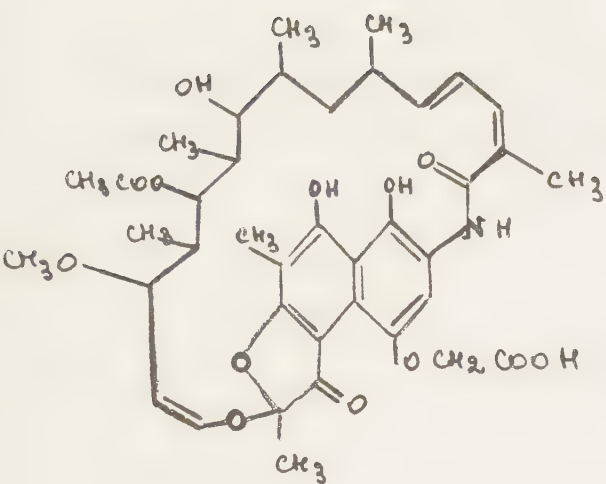
- la *rifamycine SV* (152) obtenue par élimination du groupe glycolique situé sur le C 4 du chromophore de la rifamycine B.

- la *rifampicine* le plus important des produits semi-synthétiques utilisé en thérapeutique (84, 93), qui comporte l'adjonction sur le C 3 d'une chaîne 4-méthyl pipérazino-iminométhyl.

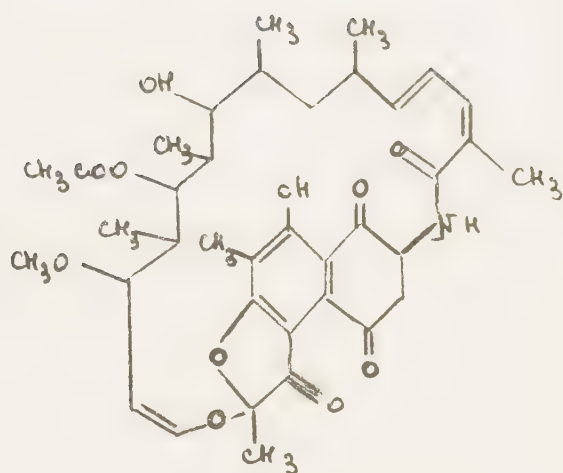
Ces dernières années leur mécanisme d'action a été élucidé (175, 180, 181) : les rifamycines inhibent l'ARN-polymérase-ADN dépendante des bactéries. Cette inhibition étant très spécifique les rifamycines sont devenues un outil très précieux dans la détermination des biosynthèses de l'ARN et des métabolismes.

L'ARN-polymérase dépendante de l'ADN est l'enzyme responsable de la synthèse de tous les ARN cellulaires utilisant l'ADN comme modèle. Elle catalyse la polymérisation de 4 ribonucléotides triphosphates en molécules d'ARN, celui-ci

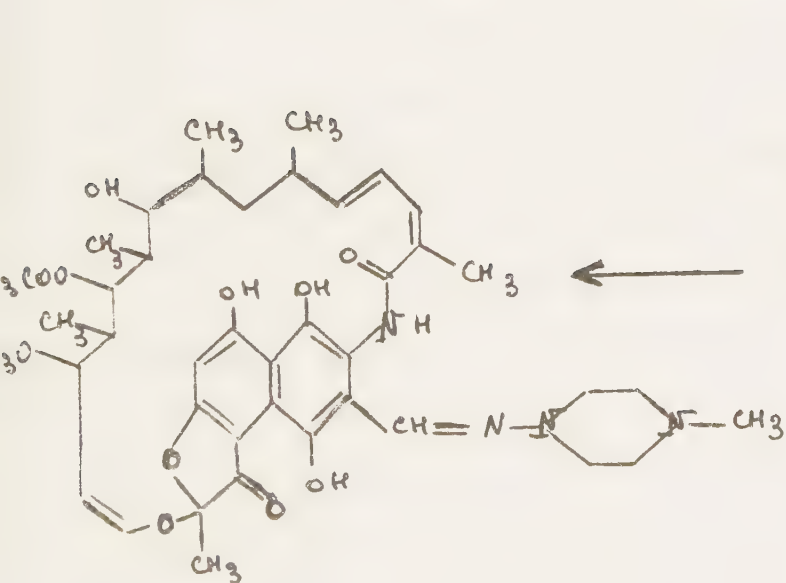




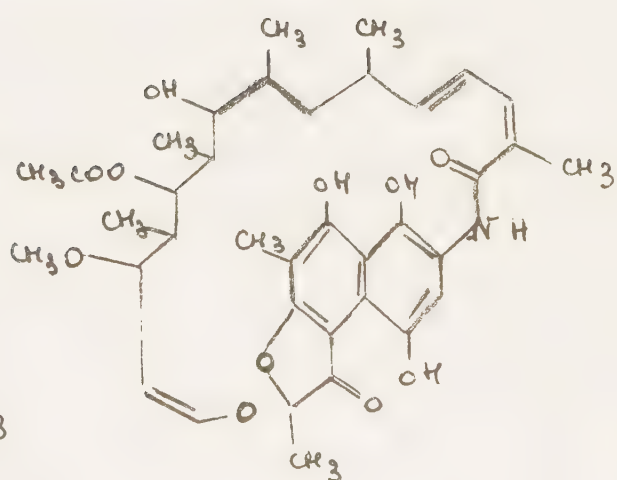
RIFAMYCINE B



RIFAMYCINE S



RIFAMPICINE

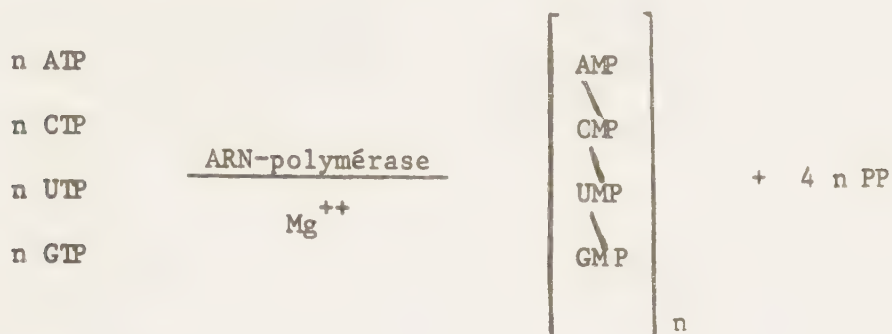


RIFAMYCINE SV

Fig. 6



étant une longue molécule non ramifiée formée des quatre types de nucléotides reliés entre eux par des liaisons phosphodiesters en 3' - 5'.



Sa *structure* et ses propriétés ont été étudiées par plusieurs auteurs et en particulier par BURGESS (24). Elle comporte plusieurs sous-unités polypeptidiques, β , β' , α , et σ ; leur assemblage selon la formule $\alpha_2 \beta \beta' \sigma$ constitue l'enzyme complet (holoenzyme) : plus récemment d'autres facteurs associés à l'enzyme ont été identifiés ; ils semblent nécessaires à la transcription mais leur rôle est encore mal connu.

L'holoenzyme peut être séparée en deux parties fonctionnelles :

- l'enzyme centrale (core-enzyme) $\alpha_2 \beta \beta'$ capable de synthétiser l'ARN mais incapable d'initier cette synthèse spécifiquement.

- le facteur σ qui agit catalytiquement pour permettre une initiation efficace de l'ARN sur les sites spécifiques de l'ADN. Il agit seulement pendant l'initiation et se détache pendant l'élongation.

Le rôle et la fonction des différentes sous-unités ont pu être étudiés grâce à l'utilisation de mutants de polymérases, ce qui a permis d'établir une corrélation entre la sous-unité mutée et la fonction altérée par la mutation. Ainsi il a été montré que des mutants résistants à la rifampicine ne fixaient pas cet antibiotique et présentaient une sous-unité β dont la mobilité électrophorétique était altérée. D'autres expériences l'ont confirmé et il est maintenant clairement établi que la sous-unité β est impliquée dans l'inhibition due



la rifampicine et que c'est elle qui fixe l'antibiotique.

Quant à la fixation sur l'ADN elle se ferait par la sous-unité β' ; mais les données expérimentales ne sont pas suffisantes à l'heure actuelle pour affirmer que seule β' est impliquée dans cette fixation. BURGESS formule l'hypothèse que β et β' possèdent des sites de fixation.

La fixation des nucléosides triphosphates à l'enzyme se ferait en deux sites différents :

- l'un d'eux, fixe les purines triphosphates ; cette fixation ne nécessite pas de Mg^{++} et est inhibée par la rifampicine. Ce site a été désigné comme le *site d'initiation*.

- le deuxième site nécessite du Mg^{++} et n'est pas inhibé par la rifampicine ; il montre une égale affinité pour tous les nucléosides des triphosphates ; il est appelé *site de polymérisation*.

Les séquences de transcription se succèdent comme il suit : l'enzyme libre se fixe de manière non spécifique et réversible sur la double hélice d'ADN puis se loge en un site spécifique de l'opéron ; cette mise en place spécifique est probablement réglée par le promoteur, de nature pyrimidique, qui pourrait être lui même ce site de fixation. Les chaînes d'ADN se séparent et il se forme un complexe très stable au site d'initiation, qui nécessite la présence de σ et dont la température optimum de fixation se situe à 37° . Ces étapes successives ont lieu même en présence de rifampicine.

Une modification de l'enzyme survient ensuite, sans doute un changement de la configuration spatiale, et il en résulte la formation d'un complexe de préinitiation qui n'est pas très stable et revient vers le stade précédent en présence de rifampicine.



Au cours de l'initiation, le nucléoside triphosphate 5' terminal qui est toujours une purine, vient se fixer sur l'enzyme ; il se forme alors un complexe tertiaire entre l'enzyme, l'ADN et le nucléoside triphosphate ; le second ribonucléoside triphosphate se lie ensuite au complexe et la première liaison phosphodiester s'établit. Puis la chaîne d'ADN qui sert de matrice est lue base après base et les différents nucléotides sont ajoutés les uns après les autres réalisant l'élongation. La fin de l'opéron étant ponctuée, lorsque l'enzyme atteint ce point la lecture est terminée, la chaîne d'ARN est libérée ainsi que l'enzyme.

Les *rifamycines* inhibent complètement la polymérisation des nucléosides triphosphates à très basses concentrations ; toutefois si l'antibiotique est ajouté après que la synthèse de l'ARN soit commencée, cette synthèse continue pendant un certain temps.

La rifampicine se lie à la sous-unité de l'ARN polymérase et inhibe une étape de la préinitiation de la biosynthèse de l'ARN qui suit la formation du complexe initial enzyme-ADN : elle n'inhibe pas la formation de ce complexe initial, qui ne nécessite pas de précurseurs ribonucléosides triphosphates, et n'inhibe pas non plus le processus d'élongation lorsqu'il est déjà engagé, dès la formation du premier lien phosphodiester. L'antibiotique n'intervient donc qu'entre ces deux étapes, gênant probablement le changement de configuration spatiale du complexe enzyme-ADN de préinitiation qui se forme juste avant la fixation du groupe purique d'initiation.

Des mesures quantitatives ont montré qu'une molécule d'holoenzyme $(\alpha_2 \beta \beta')$ ou même une molécule de core-enzyme $\alpha_2 \beta \beta'$ se liait à une molécule de rifamycine : l'antibiotique se fixe sur la sous-unité β de l'enzyme formant un complexe rifamycine-enzyme dont la stabilité détermine le degré



d'inhibition enzymatique. La diminution de la stabilité du complexe coïncide avec la diminution de l'inhibition enzymatique et cette stabilité varie avec la nature chimique des rifamycines. Ainsi l'hydrogénation successive des trois doubles liaisons de l'anse entraîne une diminution progressive de l'inhibition de l'enzyme et de la stabilité du complexe ; il est probable que ces changements altèrent la configuration stéréochimique de l'anse en détériorant leur aspect par rapport au site accepteur de l'enzyme.

Par contre il a été montré que des modifications de la partie aromatique de la molécule, telles celles qui sont observées sur les rifamycines S, SV, B et la rifampicine ont peu d'effet sur l'enzyme isolé, alors que leur influence sur la croissance bactérienne in vitro et sur leur activité chimiothérapeutique varie considérablement (182). Ceci semble dû à des différences de perméation cellulaire : la rifamycine B par exemple est très active sur l'enzyme isolée mais inactive sur la croissance bactérienne. Quant aux modifications de la chaîne aliphatique la plupart d'entre elles diminuent l'inhibition enzymatique.

L'antibiotique empêche l'initiation de la chaîne d'ARN en s'attachant fortement à la sous-unité β dans la proportion de 1/1 ; cette inhibition n'exige donc que de très faibles quantités d'enzyme, un excès équivalent au double de la drogue produisant 80 à 90 % d'inhibition.

Des mutations, entraînant le changement d'un seul acide aminé sur la sous-unité β , peuvent diminuer ou même supprimer l'inhibition enzymatique en réduisant l'affinité du site d'attachement pour les rifamycines.

Sans activité sur les ARN-polymérases dépendantes de l'ADN nucléaire des eucaryotes, les rifamycines par contre sont actives sur les enzymes mitochondriaux, inhibant la synthèse des ARN de ces organites intra-cellulaires.



1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

L'examen des lamelles en microscopie photonique fournit des renseignements d'ordre quantitatif et montre des modifications de colorations cytochimiques mais peu de modifications morphologiques.

A la 48ème heure du cycle, après 24 heures de contact avec la rifamycine et quelle que soit la dilution d'antibiotique utilisée, le nombre d'inclusions par rapport au témoin diminue : deux cellules sur 100 en moyenne sont parasitées alors qu'on en observe environ 11 sur 100 dans les témoins : les inclusions de taille moyenne, rondes ou ovales, contiennent des granules roses bien serrés les uns contre les autres. Aucune des petites inclusions compactes et bleues observées dans les témoins ne sont présentes.

Le même type d'inclusions est rencontré à la 72ème heure du cycle, après 48 heures de contact avec la rifamycine, mais il existe en plus dans ces tubes de nombreux petits corps mesurant 1 à 2 μ m, rose-vif, souvent situés près du noyau de la cellule et dont la structure est variable :

- soit amorphes, sans structure apparente, uniformément colorés en rose-rouge, entourés d'un petit halo blanc creusé dans le cytoplasme de la cellule.

- soit granuleux, toujours colorés en rose, mais bordés d'un liseré violet sur le bord interne et sans halo.

Il est difficile de savoir s'il s'agit de fraction issue du noyau telle qu'on peut en observer dans les tubes témoins ou de particules de Chlamydiae altérées par l'antibiotique. Cette difficulté n'est pas sans retentir de façon non négligeable sur la détermination du pourcentage d'infection des cellules infectées par l'agent pathogène.



Quant aux lamelles prélevées à la 96ème heure du cycle elles sont tout à fait identiques aux précédentes en ce qui concerne les dilutions à 5 et 50 µg par ml de rifamycine. Par contre les cellules ayant évolué en présence de 0,5 µg par ml d'antibiotique montrent une nette augmentation du parasitisme : 9 % des cellules présentent des inclusions alors qu'il n'en existe que 1 % dans les concentrations supérieures. Il existe en effet, en plus des inclusions de taille moyenne décrites précédemment, de toutes petites inclusions, mûrifformes, de 2 à 4 µm de diamètre, colorées en rose, souvent nombreuses dans le cytoplasme d'une même cellule. Quelquefois ce sont des particules isolées, au nombre de 4, 5 ou davantage, dispersées à la surface du cytoplasme d'une cellule qui peuvent être rencontrées.

A la suite de ces observations, il semble donc possible de dire que la rifamycine SV ajoutée 24 heures après le début de l'infection, nous a permis d'examiner un nombre faible d'inclusions, de taille moyenne, et anormalement colorées en rose, contrairement au bleu-violet habituellement rencontrées dans les témoins. Le comptage des cellules infectées donne le pourcentage moyen suivant :

RIFAMYCINE SV	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H*	48 H*	72 H*
TEMOIN	11 %	16 %	18 %
0,5 µg/ml	2 %	2 %	9 %
5 µg/ml	2 %	2 %	1 %
50 µg/ml	2 %	1 %	1 %
500 µg/ml	c e l l u l e s d é c o l l é e s		

*Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.



2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les images de microscopie électronique n'ont pu être obtenues que sur des cellules ayant cultivé en présence de 5 et 0,5 μg par ml de rifamycine car la dilution de 500 μg par ml, vraisemblablement toxique pour les cellules, les a toutes décollées des lamelles. Quant à la dilution de 50 μg par ml, malgré de très nombreuses coupes réalisées, aucune inclusion n'a pu être observée.

Il faut d'ailleurs noter que dans l'ensemble la recherche des inclusions sur les coupes a été longue car le pourcentage de cellules infectées est faible.

Les inclusions trouvées dans les cellules restées en contact avec 0,5 μg par ml de rifamycine présentent peu de modifications. De taille moyenne, ces inclusions ne renferment le plus souvent que des corps initiaux sans anomalies (*Planche 14 - Fig. 1*), tout au plus peut-on remarquer (*Planche 15 - Fig. 1*) une ondulation et un décollement prononcé des parois, certaines images montrant même la présence de figures membranaires circulaires entre la paroi et le cytoplasme bactérien. Mais généralement, comme dans les témoins, ces figures membranaires sont présentes à l'intérieur de la vacuole d'inclusion, mêlées aux particules (*Planche 14 - Fig. 1*). Les corps initiaux sont normaux, frangés de leur couronne ribosomale ; certains présentent des fissions binaires. Quelques uns pourtant montrent un éclaircissement de la partie centrale de leur cytoplasme qui filamente (*Planche 15 - Fig. 2*). Dans ces mêmes inclusions il existe des corps élémentaires dont l'aspect est identique à celui des témoins : nucléoïde excentré situé à proximité d'une vacuole vide creusée au sein du cytoplasme bactérien.

Par contre l'observation de particules isolées contenues dans des petites vacuoles (*Planche 14 - Fig. 3*), déjà bordées de mitochondries, a été

relativement fréquente. Le centre de ces particules était souvent clair, filamenteux. En plus de ces particules, des figures de taille semblable, enchassées dans le cytoplasme, finement granuleuses, dont le centre plus clair était entouré d'une couronne dense aux électrons, ont été fréquemment rencontrées (*Planche 14 - Fig. 2*).

Ce sont vraisemblablement ces deux types d'éléments qui ont déjà été rencontrés en microscopie photonique et que nous avons eu de la peine à différencier : il semble maintenant possible de dire que les particules uniformément roses et entourées d'un halo sont des Chlamydiae altérées, la vacuole entourant la particule étant responsable du halo clair observé en microscopie photonique alors que les éléments bordés d'un liseré bleu-violet sans halo, sont des fractions de noyau détachées et libres dans le cytoplasme.

En outre il existe en abondance sur ces coupes des *figures lysosomales*, soit très denses aux électrons (*Planche 16 - Fig. 1*) réparties au sein du cytoplasme, bordant quelquefois une inclusion (*Planche 14 - Fig. 1*) soit plus claires, dont les feuilletts sont bien distincts et entourent une masse informe (*Planche 14 - Fig. 2*).

Il n'est pas rare non plus de rencontrer des vacuoles de phagocytose dont la membrane, très nette, entoure des masses granuleuses très denses aux électrons accompagnées de débris (*Planche 16 - Fig. 2*).

Comparativement les inclusions rencontrées dans les cellules ayant évolué en présence de 5 µg par ml de rifamycine SV sont franchement anormales. Les corps élémentaires, peu nombreux, sont toujours normaux (*Planche 18*) alors que les corps initiaux sont généralement très perturbés, irréguliers, déformés et à cytoplasme filamenteux.



Certains clichés montrent ces corps initiaux déformés, serrés les uns contre les autres (*Planche 17 - Fig. 1*) ; leur cytoplasme n'est constitué que d'un réseau de fins filaments quelquefois un peu renflés. Certains d'entre eux bourgeonnent ou même éclatent complètement en petits bourgeons. D'autres images montrent un cytoplasme bactérien monstrueux, déformé, recroquevillé à l'intérieur d'une paroi trop grande et ondulante (*Planche 17 - Fig. 2*) ; souvent la membrane cytoplasmique de ces corps apparaît nettement, frange noire entourant un cytoplasme très éclairci. Les bourgeons eux-mêmes sont déformés, allongés, éclaircis en leur centre (*Planche 18*).

3. DISCUSSION.

Nous avons vu que l'action des rifamycines s'exerce tout d'abord sur la synthèse de l'ARN. Après l'addition de l'antibiotique le taux de synthèse de l'ARN décroît exponentiellement avec le temps, après une courte phase de latence ; ce temps de latence et la pente de la courbe d'inhibition sont d'ailleurs dépendants de la concentration en antibiotique. Les synthèses de l'ARN ribosomal, de l'ARN de transfert et de l'ARN messager sont également affectées ; la synthèse des protéines s'arrête plus tard après un intervalle de temps correspondant à la vie de l'ARN messager. Quant à l'ADN sa synthèse continue jusqu'à ce qu'un cycle de réplication complet soit achevé ; après quoi cette synthèse s'arrête puisque son initiation nécessite l'intervention d'un ribopolynucléotide.

L'action de la rifampicine ou de la rifamycine SV et de ses dérivés a été étudiée sur les Chlamydiae et en particulier sur l'agent du trachome (8, 9, 12, 13, 16, 120) ; BECKER et coll. (12) ont montré que l'activité de la rifampicine était plus grande que celle de la rifamycine SV : la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la rifampicine, déterminée en cellules



FL parasitées par la souche T'ang, est de 0,01 μg par ml alors que celle de la rifamycine SV est de 0,1 μg par ml. Ajoutés juste après l'infection des cellules ces deux antibiotiques empêchaient totalement la croissance des agents ; le rapport de 1/10ème existant entre les CMI est vraisemblablement dû à une facilité de pénétration cellulaire plus grande pour la rifampicine que pour la rifamycine SV en relation avec sa structure chimique.

Le dénombrement des inclusions en microscopie photonique au cours de nos expériences rend compte de l'inhibition exercée par la rifamycine SV sur notre agent infectieux. La dose la plus faible utilisée selon notre protocole ne laisse croître, après 24 heures et 48 heures de contact, que 2 % d'inclusions, tout comme les autres dilutions. Par contre à la 96ème heure du cycle de l'agent, soit 72 heures après l'addition de l'antibiotique, cette même dose de 0,5 μg par ml autorise la croissance d'un certain nombre d'inclusions amenant à 9 % le nombre de cellules parasitées alors que les doses plus élevées maintiennent à un taux faible ce parasitisme et même le font diminuer.

Si l'on admet la stabilité du complexe ARN polymérase-rifamycine ces inclusions ne proviennent pas de l'infection initiale des cellules par l'inoculum infectieux, chacune des particules ayant été arrêtée dans son évolution par l'antibiotique. Par contre, la rifamycine SV perdant 20 % de son activité après deux jours à 37° (152), ces petites inclusions ont peut-être pour origine les corps élémentaires formés dans quelques inclusions avant l'addition de l'antibiotique, libérés par éclatement de la cellule qui les contenait et qui sont allés parasiter des cellules intactes ; ainsi l'antibiotique à dose faible, dont une partie était inactivée, n'a pas gêné leur évolution. Par contre aux doses supérieures la quantité d'antibiotique restante était encore suffisante pour empêcher la formation d'un deuxième cycle infectieux.



Parmi les rares inclusions que nous avons rencontrées, la majorité se trouvait à un stade évolutif avancé lors de l'addition de l'antibiotique, c'est-à-dire en fait au stade où nous avons pu les observer : inclusion de taille moyenne, renfermant des corps initiaux, et pour quelques-unes, des corps élémentaires. Ces inclusions proviennent de l'évolution rapide de quelques particules infectieuses de l'inoculum initial, alors que les autres, à développement plus lent ont été inhibées par l'antibiotique. Si l'on veut chiffrer ces résultats, étant donné que les lames de réaction contenaient 2 % de cellules parasitées alors que les témoins en contenaient 16 %, cela signifie que 12,5 % environ des particules infectieuses dans les conditions de l'expérience, ont eu un développement rapide alors que les autres étaient restées dans une phase de latence dont la durée peut être évaluée à 24 heures au moins. Ces dernières particules, à développement plus lent, n'avaient pas dépassé le stade de corps initial et se trouvaient *uniques* dans une vacuole comme en témoignent les nombreux corps isolés rencontrés lors de l'examen des coupes en microscopie électronique.

Par ailleurs, l'observation des lames en *microscopie photonique* attire l'attention sur la *coloration* anormalement *rose* prise par les inclusions, laquelle révèle un changement de nature du substrat interne des particules. Selon la coloration de Giemsa les ARN se colorent en bleu et les ADN en rose ; normalement les corps initiaux des Chlamydiae sont donc colorés en bleu et les corps élémentaires, où ADN et ARN coexistent en proportions égales, le sont en violet. Ici, les particules trouvées dans les inclusions ont la même taille que les corps initiaux mais sont colorés en rose alors que les inclusions identiques sont colorées en bleu dans les témoins. Compte-tenu du mécanisme d'action des rifamycines cette dyschromasie peut s'expliquer par la disparition ou au moins la diminution des ARN des corps initiaux alors que l'ADN est présent.



En *microscopie électronique* cette disparition des ARN est nette dans certains corps initiaux où la couronne ribosomale est absente et le centre du cytoplasme, clair et filamenteux.

Il est difficile de dire à quoi est due la présence de nombreuses figures lysosomales rencontrées dans ces coupes ; peut-être comme l'a suggéré FRIIS, proviennent-elles de la destruction des particules chlamydiales rendues non infectieuses par l'antibiotique (46). Cet auteur a en effet montré que des corps élémentaires infectieux, préalablement chauffés ou mis en contact d'un antisérum, étaient phagocytés par les cellules mais se trouvaient ensuite détruits par les phosphatases lysosomales de la cellule-hôte.

Quoiqu'il en soit, l'action des rifamycines sur l'agent du trachome est effective et diminue considérablement le nombre des inclusions. Pourtant ces substances, qui semblaient pleines de promesses en ce qui concerne la thérapeutique, sont sujettes à échecs car là encore des mutants résistants sont susceptibles d'émerger (74).



II. CHLORAMPHENICOL.

Découvert dans deux laboratoires différents dès 1947 dans les cultures du Streptomyces venezuelae, le chloramphenicol a été le premier antibiotique à large spectre utilisé en thérapeutique. Il est également le premier à avoir été synthétisé chimiquement et est encore le seul à être produit industriellement de cette manière (22 - 95).

Sa *structure chimique* étant relativement simple (Fig. 7) un grand nombre de dérivés ont été préparés mais leur inactivité a permis de conclure qu'il existait une étroite relation entre la structure chimique du chloramphénicol et son activité biologique. Cet antibiotique est unique car il est le premier produit naturel trouvé qui contienne à la fois un groupement nitré et un dérivé de l'acide dichloracétique. La molécule ayant deux atomes de carbone asymétriques, quatre stéréoisomères sont possibles mais seul le D-thréo est actif. La structure du propanediol est critique pour l'activité de l'antibiotique et la chaîne ne peut être ni allongée ni substituée sans perte d'activité. Pour ce qui est du groupe acétamide il semble que ce soit la taille des constituants et son électronégativité qui influencent l'activité ; quant au groupement aromatique nitré son caractère le plus important est sa capacité polarisante.

Antibiotique à large spectre, essentiellement *bactériostatique*, le chloramphénicol inhibe la croissance d'un grand nombre de bactéries à des concentrations variant de 1 à 10 μg par ml ; presque toutes les familles sont concernées de même que les Rickettsies et les agents du groupe Psittacose-Lymphogranulomatose-Trachome (22 - 95). A ces concentrations le chloramphénicol inhibe la biosynthèse des protéines bactériennes mais n'empêche pas la formation des acides nucléiques, ni celle des parois et des polysaccharides ; chez les animaux supé-



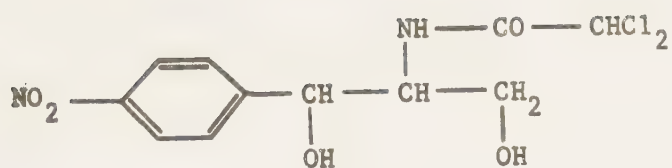
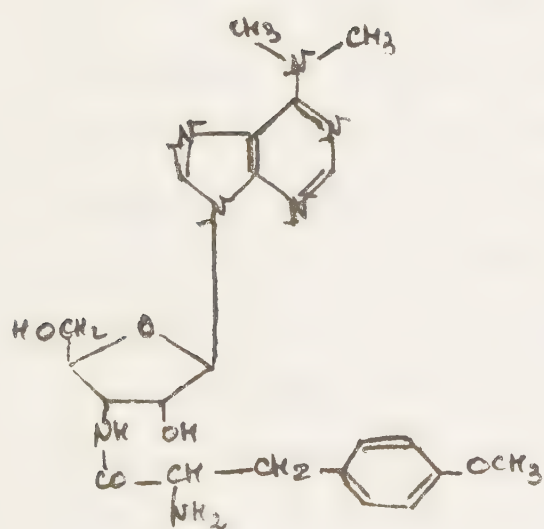
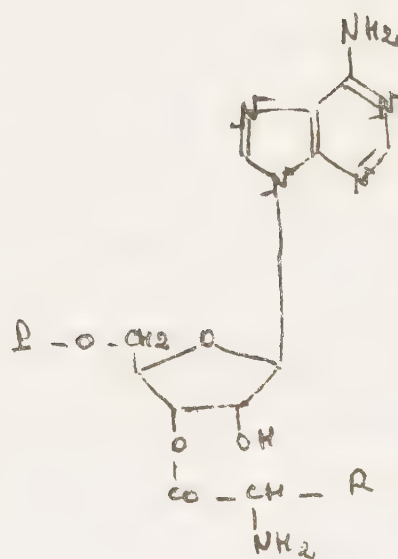


Fig. 7

CHLORAMPHENICOL



PUROMYCINE



GROUPEMENT TERMINAL ADENOSINE AMINOACYL
D'UN t-ARN

Fig. 8



rieurs des concentrations beaucoup plus grandes, de l'ordre de 300 μg par ml sont nécessaires pour inhiber la synthèse des protéines (42) ce qui suggère que le mécanisme d'action du chloramphénicol dans les cellules animales diffère de celui des bactéries.

De nombreuses expériences ont montré que l'antibiotique n'inhibait pas la première étape de la synthèse des protéines, c'est-à-dire l'activation des acides aminés, ni d'ailleurs leur transfert sur les t-ARN spécifiques car des aminoacyl-t-ARN s'accumulent dans les bactéries traitées par le chloramphénicol. Il est généralement admis que la cible de cet antibiotique est constituée par les ribosomes de procaryotes, le chloramphénicol se fixant sur la sous-unité 50 S à raison d'une molécule par sous-unité (184).

Il intervient probablement lors de l'établissement de la liaison peptidique car il n'inhibe pas l'initiation des chaînes polypeptidiques mais leur élongation. En effet le chloramphénicol inhibe la formation du complexe peptidyl-puromycine (Fig. 8) ce dernier antibiotique se comportant comme un aminoacyl-t-ARN acceptant le groupe peptidyl de la chaîne protéique en formation située sur le site P du ribosome.

VASQUEZ et coll. (176) ont localisé le site de fixation du chloramphénicol sur la fraction β -core de la sous-unité 50 S, laquelle catalyse encore la réaction de transfert, alors qu'il ne se fixe plus sur le γ -core. Rappelons que le passage du β -core au γ -core se fait par élimination de cinq protéines basiques, dont la peptidyl-transférase. En fonction de certaines conditions ioniques et de température il est possible d'inactiver réversiblement l'activité de la peptidyl-transférase ; or la capacité de la sous-unité 50 S à lier le chloramphénicol est parallèle à l'activité de la peptidyl-transférase.



Il est vraisemblable que le chloramphénicol intervient au niveau de la zone de reconnaissance du groupe peptidyl du site peptidyl-transférase de la sous-unité 50 S. Il inhibe aussi la réaction de terminaison obtenue en présence d'un codon non sens à partir du f-méth.t-ARN fixé en position P sur les ribosomes.

En général, le chloramphénicol semble ne pas avoir d'effet sur les *cellules animales* ; mais s'il n'inhibe pas la synthèse des protéines au niveau des ribosomes 80 S des eucaryotes, il inhibe par contre celle des mitochondries dont les ribosomes 70 S sont procaryotiques. L'action du chloramphénicol sur ces cellules ne se manifeste qu'à partir de 100, 150 $\mu\text{g/ml}$, la respiration cellulaire étant inhibée (42).

Chez les *bactéries*, en présence de chloramphénicol la synthèse des protéines est inhibée mais il y a une synthèse et une *accumulation importante d'ARN*. Leur synthèse est stimulée dans des cultures poussant lentement en milieu glucose, le chloramphénicol produisant une accélération immédiate deux à trois fois plus importante. Cette accélération apparente est due en particulier à la stabilisation de l'ARN-m formé après l'addition du chloramphénicol. Cependant l'ARN accumulé contient tous les types d'ARN : ARN-messager, ARN de transfert, ARN ribosomique.

Quant à l'ADN synthétisé en présence de chloramphénicol, il semble normal.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

L'aspect des inclusions rencontrées sur les différentes lames est assez homogène. A n'importe quel temps de prélèvement, que ce soit à la 48ème heure, à la 72ème ou à la 96ème heure du cycle de l'agent, la plupart des inclusions



sont, en valeur moyenne, de taille nettement inférieure à celles trouvées dans les témoins et ont toutes la même teinte bleue très foncée.

En présence de $0,5 \mu\text{g par ml}$ de chloramphénicol il persiste un assez grand nombre d'inclusions ; leur aspect est le suivant :

- petites ou moyennes inclusions de 2 à $10 \mu\text{m}$ de diamètre, rondes ou légèrement ovales à contours irréguliers, quelquefois bosselées, compactes, très denses, à l'intérieur desquelles on ne distingue aucune structure. Leur teinte est bleue très foncée, quelquefois noire évoquant l'image d'une tache d'encre.

- quelques inclusions dont le nombre est restreint sont plus grandes, ovales ou incurvées sur le noyau. Elles occupent une grande partie du cytoplasme de la cellule-hôte et contiennent de nombreux granules bien distincts, de taille et de teinte différentes : les plus gros sont noirs, mêlés à de nombreux petits corpuscules roses ; quelques-uns sont violet-rose.

Certaines inclusions de taille moyenne surtout rencontrées à la 72ème heure du cycle prennent une teinte pourpre foncé et l'on distingue au milieu de cette gangue rougeâtre de gros granules noirs.

Les inclusions trouvées dans les cellules cultivées en présence de 5 et $50 \mu\text{g par ml}$ de chloramphénicol sont beaucoup moins nombreuses, mais du même type que précédemment.

Quant aux cellules cultivées avec $500 \mu\text{g par ml}$, elles présentent des altérations importantes, notamment une vacuolisation très prononcée du cytoplasme cellulaire. Une seule inclusion a été observée après comptage de 600 de ces cellules.



Ainsi la dilution d'antibiotique a peu d'importance sur l'aspect des inclusions ; que les cellules aient été cultivées avec 0,5 - 5 ou 50 µg par ml de chloramphénicol leur aspect en microscopie photonique est le même, seul leur nombre varie, comme le montre le tableau suivant :

CHLORAMPHENICOL	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H*	48 H*	72 H*
TEMOIN	21 %	26 %	22 %
0,5 µg/ml	10 %	15 %	12 %
5 µg/ml	8 %	2,5 %	3 %
50 µg/ml	3 %	0,007 %	0,05 %
500 µg/ml	3 %	0,005 %	0 %

* Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.

En présence de 0,5 µg par ml ce nombre est réduit de moitié par rapport aux témoins tandis qu'avec 5 µg par ml il n'existe plus que le 1/10ème des inclusions ; avec 50 et 500 µg par ml pratiquement aucune cellule n'est plus parasitée.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'observation a surtout été réalisée dans les cellules cultivées avec 0,5 et 5 µg par ml de chloramphénicol où le nombre des inclusions était suffisamment élevé ; par contre très peu d'entre elles ont été rencontrées avec 50 µg et aucune avec 500 µg par ml.



Apparemment peu de modifications morphologiques sont survenues. Les grandes inclusions sont rares ; celles que nous avons rencontrées occupent une grande surface de la coupe cellulaire, mesurent environ 20 μ m de long dans leur plus grand diamètre et contiennent les trois types de particules. Toutefois le nombre de corps intermédiaires qu'elles contiennent paraît assez important, ces corps en cocarde étant très visibles sur la *planche 19* ; par contre on trouve relativement peu de corps élémentaires. Les corps initiaux sont normaux, garnis de leur couronne ribosomale ; quelques-uns d'entre eux ont une taille supérieure à la normale. Toujours sur le cliché de la *planche 19* on distingue, entre le noyau et l'inclusion des corps initiaux isolés n'ayant pas fusionnés avec l'inclusion principale. L'un d'eux présente une petite cocarde en son centre annonçant la transformation en corps intermédiaire.

Sur la *planche 20* on peut voir trois petites inclusions contenant peu de particules, surtout corps initiaux et corps intermédiaires, et de nombreux cercles membranaires. Deux de ces inclusions ont fusionné et l'on distingue encore les restes d'un pont cytoplasmique ayant existé entre les deux inclusions. Sur le pourtour des deux plus petites il existe des mitochondries extrêmement aplaties et étroitement appliquées sur leur contour.

Mais les inclusions les plus fréquemment rencontrées sont petites ou moyennes, de 3 à 10 μ m de long dans leur plus grand diamètre et ne contiennent que des corps initiaux ou parfois quelques corps intermédiaires (*Planche 21 et 22*). Tous les corps initiaux sont apparemment normaux, bien que bon nombre d'entre eux soient plus contrastés que dans les témoins : la couronne ribosomale est plus dense (*Planche 22 - Fig. 1*) et même le centre de ces corps est plus chargé en particules ribosomales. La division de certains de ces corps est anormale. La *figure 1* de la *planche 21* et la *figure 1* de la *planche 22* nous en montrent deux pourvus en leur centre d'une ligne de séparation mais toujours accolés et entourés de la paroi. Aucune image classique de fission binaire avec étranglement central n'a été rencontrée.



Dans les cellules cultivées avec 5 μ g par ml de chloramphénicol peu d'inclusions ont pu être examinées. Toujours de petite taille elles ne contiennent que des corps initiaux (*Planche 23*). Ceux-ci apparaissent fortement remplis de granules denses aux électrons de nature ribosomale dont la répartition ne se fait pas spécialement en couronne mais sur toute la surface de la coupe bactérienne (*Planche 23 - Fig. 2*). L'un de ces corps situé dans la partie inférieure de l'inclusion de la *Fig. 2 de la planche 23* présente une protubérance séparée du reste du cytoplasme bactérien par une ligne de démarcation à peine perceptible, irrégulièrement tracée ; sur ce cliché on peut encore apercevoir les restes diffus d'un corps initial lysé. A l'extérieur de l'inclusion, il existe un petit corps initial entouré de feuilletts denses aux électrons et à proximité de celui-ci une figure myélinique.

Les seules inclusions rencontrées sur les coupes des cellules cultivées avec 50 μ g par ml d'antibiotique sont celles de la *planche 24* ; elles ne contiennent que des corps initiaux dont la couronne ribosomale est très dense. Ces cellules contiennent souvent de nombreuses vacuoles claires telles qu'elles apparaissent sur la *planche 24*.

3. DISCUSSION.

La lecture des lames en microscopie photonique permet de dégager deux points :

- l'action de l'antibiotique réduit efficacement le nombre des cellules parasitées.
- les inclusions persistantes restent de petite taille, sont bloquées à un stade précoce d'évolution et n'arrivent pas à maturité.

Très peu d'inclusions renfermant des corps élémentaires ont été rencontrées. Même les grandes inclusions, telle celle qui a été décrite *Planche 19*.

ne contiennent qu'une faible proportion de corps élémentaires mûrs. Par contre les corps intermédiaires sont beaucoup plus nombreux qu'ils ne le sont normalement, dans une inclusion de cette taille qui semble arrivée à maturité. Grossièrement nous avons essayé d'établir un rapport entre ces divers éléments rencontrés les uns dans une inclusion témoin, les autres dans une inclusion dont l'évolution s'est faite en partie en présence de 0,5 µg par ml de l'antibiotique.

L'inclusion témoin de la *planche 2*, qui est une fraction d'inclusion arrivée à maturité, mesure approximativement 10 µm de long sur 7,5 µm. Elle contient 13 corps intermédiaires et 71 corps élémentaires répartis sur une surface de 75 µm².

Par contre l'inclusion de la *planche 19* mesure 20 µm sur 7,5, soit une surface de 150 µm² et contient 63 corps intermédiaires et 33 corps élémentaires.

Les rapports suivants pourront être établis :

- surface de l'inclusion témoin x 2 = surface de l'inclusion chloramphénicol soit 75 µm² x 2 = 150 µm²

Pour l'inclusion témoin les chiffres sont les suivants :

- surface = 75 µm² x 2 = 150 µm²
- nombre de corps intermédiaires = 13 x 2 = 26
- nombre de corps élémentaires = 71 x 2 = 142

Ainsi ramené à la même surface nous avons :

Témoin		Chloramphénicol	Rapport $\frac{\text{chloramphénicol}}{\text{Témoin}}$
Corps intermédiaires	26	63	$\frac{63}{26} \approx 2,5$
Corps élémentaires	142	33	$\frac{33}{142} \approx 0,25$

Donc l'inclusion soumise à l'action du chloramphénicol contient 2,5 fois plus de corps intermédiaires que l'inclusion témoin et 4 fois moins de corps élémentaires.

Le même rapport peut être effectué pour les corps initiaux :

- 128 corps initiaux dans les inclusions avec chloramphénicol
- $27 \times 2 = 54$ corps intermédiaires dans les inclusions témoins.

soit grossièrement environ deux fois plus de corps initiaux.

Ainsi l'inclusion avec chloramphénicol contient pour une même surface et à un degré de maturité équivalent --- 4 fois moins de corps élémentaires qu'une inclusion témoin mais 2 fois plus de corps intermédiaires et 2 fois plus de corps initiaux, ce qui indique le *blocage de maturation des uns au détriment des autres*.

Cette diminution des corps élémentaires infectieux provient de l'arrêt de maturation des particules, les unes déjà bien évoluées mais ne pouvant achever leur maturation et se trouvant bloquées au stade corps intermédiaires, les autres restées à un stade plus précoce, celui du corps initial.

Les modifications se résument donc à ceci :

- blocage au stade corps initial ou au stade corps intermédiaire
- augmentation de la charge en ribosomes
- anomalie de fission des corps initiaux.

Nous avons vu précédemment que le chloramphénicol empêchait l'élongation des chaînes polypeptidiques en formation et entraînait une accumulation des acides ribonucléiques. La présence de ces acides ribonucléiques sur les coupes de microscopie électronique se manifeste par l'augmentation du nombre des ribosomes, les uns représentant l'excès d'ARN ribosomal synthétisé et accumulé, les autres les ribosomes actifs au moment de l'addition du chloramphénicol et figés dans leur mouvement de translation. Cette accumulation d'acides ribo-

nucléiques est d'ailleurs visible en microscopie photonique, où les inclusions ont toutes une teinte bleue très foncée : la très grande quantité d'ARN les amène même à prendre une intensité de coloration telle qu'elles paraissent noires.

Quant aux grandes inclusions qui, en microscopie photonique, contiennent une forte proportion de granules, non pas violet comme on les rencontre habituellement dans ces inclusions mûres, mais roses nous pensons qu'elles sont identiques à des inclusions, telles celles de la *planche 19* observées en microscopie électronique ; ces granules roses représentent peut-être les corps intermédiaires dont le nucléoïde constitué d'ADN se colore en rose et reste individualisé et non mêlé aux acides ribonucléiques restés en couronne autour de la particule.

De plus au-delà d'une certaine dose de chloramphénicol il est vraisemblable qu'une action indirecte sur la cellule intervient. FIRKIN et coll. (42) ont montré que jusqu'à 20 μg de chloramphénicol le taux de croissance des cellules HeLa était relativement normal mais au-delà de cette dose la croissance diminuait puis cessait, vraisemblablement à cause d'une diminution de la capacité respiratoire ; à des doses de 100, 150 μg par ml la croissance cessait immédiatement à cause de l'effet direct sur la production d'énergie. La disparition quasi totale des inclusions dans les cellules renfermant 50 et 500 μg par ml de l'antibiotique peut en effet être due non seulement à l'action directe sur la synthèse des protéines bactériennes mais aussi à la destruction d'un certain nombre de cellules, ces cellules parasitées étant peut-être plus fragiles que les cellules non parasitées. En outre les cellules cultivées avec 500 μg par ml de l'antibiotique et observées en microscopie électronique étaient toutes profondément désorganisées alors qu'en microscopie photonique les seules manifestations consistaient en microvacuoles cytoplasmiques.

Récemment TRIBBY a réalisé le même type d'expérience avec *Chlamydia psittaci* (172) ; il a suivi les synthèses des protéines, d'ARN et d'ADN après addition de chloramphénicol pendant des périodes de 15 mn à 1 heure après l'addition de 80 µg par ml d'antibiotique, puis pendant des périodes successives de 1 heure ; les résultats sont les suivants :

Temps d'incorporation (en heure après l'addition de l'antibiotique)	INCORPORATION DES INTERMEDIAIRES MARQUES (cpm/ 10 ⁶ cellules L)					
	PROTEINE		ARN		ADN	
	C H L O R A M P H E N I C O L					
	-	+	-	+	-	+
0 - 0,25	7,4	5,27	3	3,85	2,98	2,84
0 - 1	39,4	18,3	22,3	18,7	23,9	19,3

Il constate que l'action immédiate est celle qui s'exerce sur la synthèse des protéines alors que les synthèses d'ADN et d'ARN ne sont pas atteintes ; par contre, après la 2ème heure de contact, ces deux dernières synthèses sont elles aussi ralenties.

De même ALEXANDER (2) étudiant l'action du chloramphénicol sur l'agent de la méningopneumonie en cellule L constate en suivant l'incorporation d'acides aminés marqués qu'aucune synthèse protéique n'est décelable quand l'antibiotique est ajouté au milieu de culture pendant les vingt premières heures de l'infection à la dose de 40 µg par ml.

Tous ces résultats rejoignent également ceux de TARIZZO et NABLI d'une part (167, 168), BARKER d'autre part (7), qui constataient l'inhibition des *Chlamydiae* par le chloramphénicol.

III. GENTAMICINE.

Identifiées depuis 1963, les gentamicines sont issues de la fermentation d'actinomycètes du genre Micromonospora, en particulier Micromonospora purpurea, et appartiennent au groupe des aminoglycosides ou aminosides. Ces derniers sont des antibiotiques composés de sucres aminés parmi lesquels on distingue deux grands groupes :

- le groupe de la *streptomycine* et de ses dérivés, constitué d'une molécule de streptidine associée à 1 pentose, le streptose, et à une molécule de glucosamine (*Fig. 9*).

Premier antibiotique découvert dans ce groupe, la streptomycine a été isolée en 1944 par WAKSMAN à partir du filtrat de culture de *Streptomyces griseus*. C'est un antibiotique à large spectre qui est actif à la fois contre les bactéries à Gram positif et négatif.

- le groupe des *désoxystreptamines* qui renferme des composés ayant un noyau désoxytreptamine. Ce groupe est lui-même sous divisé en deux sous-groupes selon que les sucres associés sont liés à des carbones adjacents ou non de ce noyau desoxystreptamine.

Le premier sous-groupe (*Fig. 10*) (desoxystreptamine substituée sur les hydroxyles adjacents) comprend les néomycines, paromomycines, lividomycines, ribostamycines, butyrosines. Ces antibiotiques fixent tous une molécule de ribose.

Le deuxième sous-groupe (*Fig. 11*) (desoxystreptamine substituée sur les hydroxyles non adjacents) comprend les kanamycines, les *gentamicines*, les nébramycines, et les sisomicines.

La gentamicine brute peut-être séparée en plusieurs constituants après chromatographie sur résine fortement basique.

- la gentamicine A résulte de la liaison glycosidique d'une molécule

AMINOSIDES

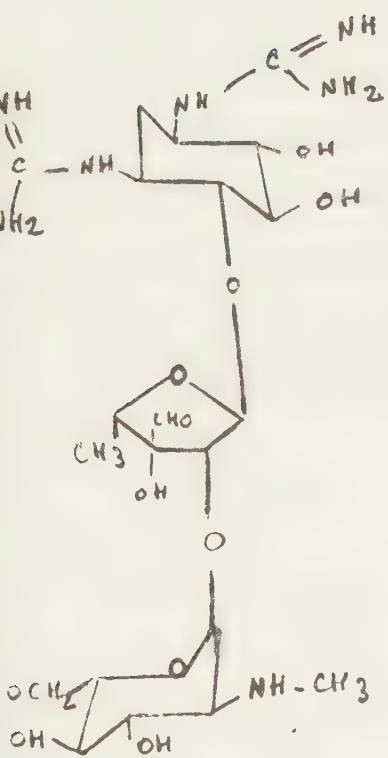


Fig. 9

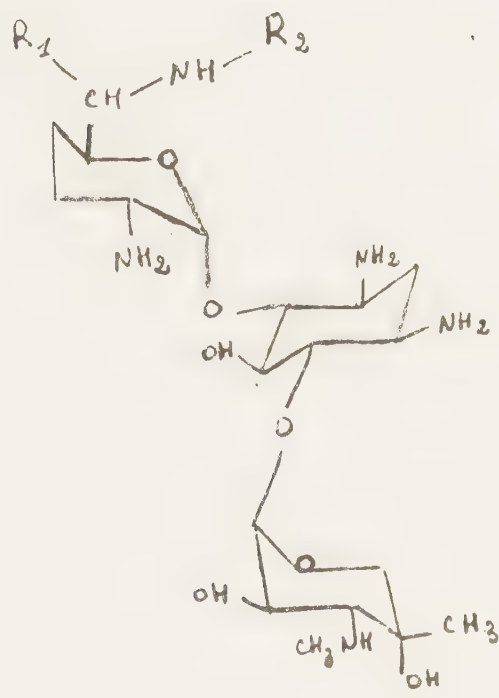
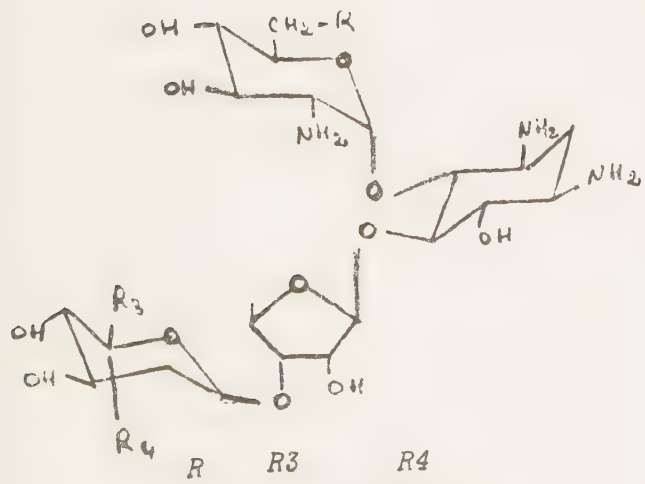


Fig. 12

	R1	R2
C1	CH3	CH3
C1a	H	H
C2	CH3	H

STREPTOMYCINE

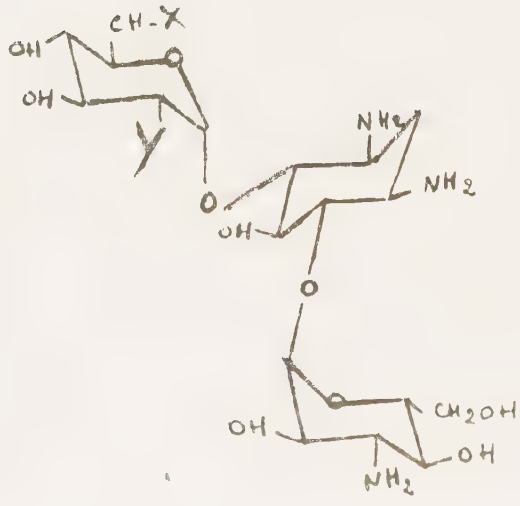


	R	R3	R4
Streptomycine B	NH2	H	CH2NH2
" C	NH2	CH2NH2	H
"	NH2	CH2NH2	H
Paromomycine	OH	H	CH2NH2

Fig. 10

1er Sous-groupe

GENTAMICINES



	X
A	NH2
B	NH2
C	OH

Fig. 11

2ème Sous-groupe

DESOXYSTREPTAMINES

de glucosamine d'une part, et d'un sucre particulier la gentosamine d'autre part, avec les hydroxyles 4 et 6 de la desoxystreptamine.

- la *gentamicine C* qui est la gentamicine commerciale, est un mélange de trois composants C1, C1a et C2. Ces gentamicines comportent deux sucres aminés spécifiques, la garosamine et la purpurosamine liés à la desoxystreptamine par les oses en 4 et 6 également. Leur structure figure sur la *fig. 12*.

Il ressort des études entreprises dans différents laboratoires et portant sur la gentamicine, que son action est semblable à celle de la streptomycine et des autres aminosides (52183) ; le mécanisme d'action de cette famille d'antibiotique ayant été élucidé à partir de la streptomycine, c'est essentiellement à cet antibiotique que nous nous référerons. (33 - 34 - 35 - 111).

L'un des effets fondamentaux de l'action de la streptomycine est *l'inhibition de la synthèse des protéines*. Elle agit en se fixant sur les sous-unités ribosomales 30 S des bactéries sensibles et détermine des erreurs de lecture pendant la traduction de l'ARN-m, au cours du processus de reconnaissance codon-anticodon ; elle interrompt probablement le cycle de fonction des ribosomes au stade de l'initiation. De nombreuses études tant *in vivo*, qu'avec des systèmes acellulaires *in vitro*, ont précisé la nature de l'effet de l'antibiotique.

La fixation sur la sous-unité 30 S a été démontrée sur des systèmes acellulaires constitués de ribosomes provenant, les uns de bactéries sensibles, les autres de bactéries résistantes. En dissociant les ribosomes en leur sous-unités et en réassociant par exemple des sous-unités 30 S sensibles avec des sous-unités 50 S résistantes on obtient des ribosomes 70 S sensibles à la streptomycine, alors que l'association inverse entraîne la formation d'unités 70 S insensibles.

Ultérieurement il a été établi que cette liaison était spécifique et qu'une seule mutation suffisait à supprimer la capacité de ces sous-unités à lier l'antibiotique. L'élément responsable de cette sensibilité au sein de la

sous-unité 30 S serait une protéine, appelée protéine P 10. D'autres protéines sont d'ailleurs susceptibles d'être impliquées dans ce mécanisme de liaison.

Après fixation sur la sous-unité 30 S, la streptomycine provoque des *erreurs de lecture* de certains codons de l'ARN-m. En effet si dans un système acellulaire, un polynucléotide d'uridine dirige la formation de polyphénylalanine, l'addition de streptomycine à ce système inhibe partiellement l'incorporation de phénylalanine et entraîne celle d'isoleucine.

L'incorporation de l'isoleucine à la place de la phénylalanine correspond à une erreur de lecture sur la première lettre du codon. Le codon de la phénylalanine est en effet UUU et celui de l'isoleucine AUU ; en présence de streptomycine, le codon UUU devient équivalent à AUU.

Il semble d'autre part que les erreurs de lecture induites par la streptomycine ne surviennent que lorsque la sous-unité 30 S qui fixe la streptomycine est liée à la sous-unité 50 S pour former l'unité ribosomale. LUZATTO a montré que cette action se situait au niveau de *l'initiation de la synthèse protéique* (92). Etudiant l'effet de la streptomycine sur les polysomes, dans des conditions où l'élongation des chaînes polypeptidiques déjà amorcée n'est pas inhibée, ils ont constaté l'accumulation des complexes ribosomes 70 S - m-ARN et ont émis l'hypothèse que le cycle des ribosomes était interrompu au stade de l'initiation bloquant les ribosomes 70 S sur la chaîne d'ARN-m.

Plus tard LELONG et Coll. (80) ont montré que la streptomycine chassait le f-méth.t-ARN du complexe d'initiation, quand celui-ci était dans une position telle qu'il puisse réagir avec la puromycine. ZAGORSKA et Coll. (195) ont précisé que tant que ce f-méth. t-ARN n'était pas ajusté correctement au site P, le système était insensible à la streptomycine.

L'utilisation de la streptomycine marquée au C 14 a permis de mettre en évidence deux étapes de pénétration dans ces bactéries :

- d'abord une fixation instantanée à l'extérieur de la membrane cellu-

laire.

- puis une fixation secondaire correspondant à la pénétration de l'antibiotique à travers la membrane lésée.

Il semble en effet que la streptomycine provoque des lésions de la membrane cellulaire : sous son influence E. coli excrète dans le milieu extérieur des 5' ribonucléotides mais ceci pour des doses supérieures à celles qui sont nécessaires à l'action bactéricide. Il a également été constaté des fuites de K^+ mettant en évidence cette modification de la membrane.

Quant aux synthèses d'ADN et d'ARN elles continuent assez longtemps même lorsque l'inhibition des synthèses protéiques est manifeste.

Enfin la streptomycine est sans action sur les cellules de mammifères car il semble qu'elle ne puisse pas pénétrer (174).

La gentamicine présente le même effet bactéricide que la streptomycine (103-145) : ajoutée à une culture d'E. coli en phase exponentielle de croissance, elle entraîne une diminution du nombre de bactéries viables. Dans un milieu renfermant de la phénylalanine marquée au C 14, la gentamicine inhibe complètement l'incorporation de cet acide aminé alors que l'incorporation de thymidine marquée continue montrant ainsi que la biosynthèse de l'ADN se poursuit de même d'ailleurs que la biosynthèse de l'ARN. La gentamicine est donc un inhibiteur spécifique de la synthèse protéique chez les bactéries sensibles, à des doses variant de 0,1 à 5 $\mu\text{g/ml}$.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Peu de modifications sont visibles en microscopie photonique. A la 48^{ème} heure du cycle les cellules infectées cultivées en présence de 0,5 et 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine sont normales à chacun des temps de prélèvements. Aucune anomalie majeure par rapport aux témoins n'a pu être retenue. Il en est de même

des lamelles cultivées avec 50 et 500 $\mu\text{g/ml}$ après 24 heures de contact avec la gentamicine.

Après 48 heures de contact, soit rappelons le à la 72ème heure du cycle, les cellules cultivées avec 50 $\mu\text{g/ml}$ d'antibiotique présentent quelques rares modifications. La plupart des inclusions rencontrées sont normales ; seul un petit nombre contient des particules un peu plus grosses qu'elles ne le sont habituellement bien serrées les unes contre les autres, de coloration rose-pourpre, faisant songer à un sac de billes.

Par contre, en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$, les inclusions sont souvent de petite taille ou moyenne, d'un bleu foncé et aucune structure n'est distincte à l'intérieur. Ces inclusions sont à un stade précoce d'évolution, beaucoup plus en retard que les inclusions observées dans les témoins correspondants. Quelques unes sont plus grandes et contiennent les mêmes particules roses, très serrées, précédemment décrites.

A la 96ème heure du cycle, après 72 heures de contact avec la gentamicine, les cellules cultivées en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ contiennent une majorité d'inclusions normales ; quelques unes montrent toujours des granules rose-pourpre un peu boursoufflés au-dessus desquels se détachent de très rares éléments plus gros.

Quant aux cellules cultivées en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$, un grand nombre d'entre elles se sont décollées et il existe des débris cellulaires sur la lamelle. Il reste peu de cellules parasitées et les inclusions sont normales.

La détermination du pourcentage d'infection cellulaire ne nous permet pas de tirer beaucoup de conclusions comme le montre le tableau suivant :



GENTAMICINE	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H*	48 H*	72 H*
TEMOIN	39 %	42 %	47 %
0,5 µg/ml	27 %	40 %	48,5 %
5 µg/ml	24 %	35 %	49 %
50 µg/ml	16 %	50 %	46 %
500 µg/ml	11 %	34 %	10 %

*Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.

- POURCENTAGE D'INFECTION CELLULAIRE -

Les doses les plus faibles n'empêchent pas les inclusions d'évoluer, le nombre de cellules parasitées étant identique aux 72ème et 96ème heures du cycle ; tout au plus peut-on noter un ralentissement de l'évolution pendant les 24 premières heures de contact qui semble en relation avec la dose d'antibiotique. Par contre la dose de 500 µg/ml diminue notablement l'infection des cellules surtout à la 48ème et à la 96ème heure du cycle.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Aucune modification n'a été observée dans les inclusions provenant des cellules cultivées avec 0,5 et 5 µg/ml d'antibiotique.

Quant à celles qui ont pu être examinées dans les cellules cultivées avec 50 µg/ml, la plupart sont normales aussi ; assez grandes, ces inclusions renferment les trois types de particules dont l'évolution s'est poursuivie normalement (Planche 22 - Fig. 2). Des fissions de corps initiaux et de corps

intermédiaires sont visibles ; l'aspect des particules infectieuses mûres est identique à celui rencontré dans les témoins.

Cependant quelques inclusions, de petite taille, contiennent peu de particules et certaines sont franchement anormales. Ainsi la fig. 1 de la planche 27 montre un corps initial géant dont la taille atteint $4\text{ }\mu\text{m}$, mêlé à des corps initiaux et des corps élémentaires. Une grande vacuole, de $2\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, certie d'une ligne de condensation ribosomale est creusée dans son cytoplasme et renferme deux silhouettes membranaires. A proximité de cette vacuole, le cytoplasme bactérien s'est fragmenté en deux masses dont l'une possède un contour sphérique et l'autre, plus grosse, est irrégulière.

Par contre presque toutes les inclusions examinées dans les cellules cultivées avec $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ de gentamicine présentent un caractère *anormal*. La majorité d'entre elles ne renferment pas ou peu de corps élémentaires mais des *corps initiaux* (Planches 28 - 29 - 30). Ceux-ci peuvent être allongés ou aplatis comme sur la planche 28 ; parfaitement délimités par leurs enveloppes les uns laissent apparaître un cytoplasme filamenteux, clair, pauvre en ribosomes, mais ceux-ci existent quand même à la périphérie. D'autres, situés dans la même inclusion sont plus riches en ribosomes et ces derniers sont répartis sur toute la surface du corps initial.

L'un de ces corps initiaux, situé dans la partie inférieure gauche du cliché, possède un cytoplasme très effiloché. Sur d'autres de nombreux petits bourgeons sont visibles. Les quelques mitochondries réparties autour de la vacuole, qui est nettement visible - présentent de nombreuses petites mottes très foncées.

Mais bien souvent la taille des corps initiaux est supérieure à la normale et leur diamètre mesure plus d' $1\text{ }\mu\text{m}$ (Planche 29). Les corps initiaux présents sur ce cliché sont assez riches en ribosomes, tant à la périphérie du corps

qu'en son centre et montrent de nombreux bourgeons très denses aux électrons. Certains laissent voir un cytoplasme recroquevillé à l'intérieur de leurs enveloppes. Signalons la présence d'un corps élémentaire normal.

Mais ce qui nous a surpris à l'examen d'un grand nombre de ces inclusions c'est la présence à l'intérieur de ce qui devrait être la vacuole, entre les corps initiaux, de granulations ribosomales identiques à celles de la cellule-hôte. Cet aspect est encore plus visible sur la planche 30 - Fig. 1 et 2. Aucune limite vacuolaire n'est décelée : les corps initiaux sont répartis de manière diffuse dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Leur cytoplasme n'apparaît pas homogène mais marbré, des zones claires alternant avec des plaques de ribosomes ; cet aspect est particulièrement net dans le corps initial géant de la fig. 1. Certains d'entre eux sont même complètement clairs en leur centre.

Les mitochondries, toujours présentes autour de l'inclusion, mais peu nombreuses, viennent directement en contact des corps initiaux.

3. DISCUSSION.

A la suite de cette étude il est clair que la gentamicine est inutilisable dans la thérapeutique anti-trachomateuse. Le pourcentage d'infection cellulaire est identique dans les tubes témoins et les tubes de réactions aux doses thérapeutiques et même à des concentrations dix fois plus grandes telles 50 $\mu\text{g/ml}$. Seule la dose considérable de 500 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une diminution notable du nombre des inclusions.

Quant aux modifications, elles n'apparaissent qu'avec 50 $\mu\text{g/ml}$ mais elles sont très rares ; seule encore la dose de 500 $\mu\text{g/ml}$ est accompagnée d'un blocage de maturation des inclusions. En microscopie photonique celui-ci se manifeste par la présence d'inclusions de petite taille ou de taille moyenne, d'un

bleu très foncé, caractéristique des inclusions se trouvant à un stade précoce d'évolution et comportant une grande quantité d'AXN. La microscopie électronique ces observations sont confirmées par le fait que l'on ne rencontre *que des inclusions contenant des corps initiaux* ; pratiquement aucune particule mûre n'est trouvée dans ces inclusions.

Il faut cependant signaler que, si la majorité des inclusions sont de ce type, il s'en trouve quand même quelques unes qui contiennent des particules mûres, ces inclusions s'étant sans doute trouvées à un stade plus avancé au moment de l'addition de l'antibiotique.

Les corps initiaux qui ont pu être observés ont souvent une forme irrégulière et sont légèrement augmentés de taille. Mais ce qui est le plus frappant dans certaines inclusions c'est la *disparition de la membrane limitant ces inclusions* : il n'existe pas de vacuole proprement dite, entourée d'une membrane identique à la membrane cellulaire et qui se trouve normalement autour des inclusions qui se développent après phagocytose des particules infectieuses ; il est facile d'apercevoir sur de nombreux clichés la présence de cytoplasme cellulaire entre les corps initiaux. La signification de ce phénomène nous est inconnue et il nous est difficile d'en donner une explication.

Peut-être s'agit-il d'une action de l'antibiotique non pas sur le germe, mais sur la cellule-hôte ? En effet, une étude de DIXON et Coll. (38) sur l'effet de certains antibiotiques — dont un aminoside voisin de la gentamicine, la paromomycine — sur la croissance et la respiration des cellules Hela montre qu'aux doses faibles (jusqu'à 30 µg/ml) cet antibiotique est sans effet sur les cellules ; alors qu'à 300 µg/ml, bien que la respiration cellulaire ne soit toujours pas atteinte, les cellules cessent de croître. Les causes de cette inhibition ne sont pas connues. Mais ici l'effet cytotoxique de la gentamicine à hautes doses nous paraît important sur les cellules KB infectées puisqu'un grand nombre d'entre elles étaient décollées alors que les cellules non infectées cultivées

en présence de la même dose d'antibiotique ne présentaient pas ce phénomène. Nous pensons que les cellules dont les inclusions étaient arrivées à maturité, étaient plus fragiles, plus sensibles à l'action toxique des hautes doses d'antibiotique. Leur destruction préférentielle expliquerait alors qu'il ne reste que des cellules dont les inclusions sont jeunes.

Pour expliquer la multiplication diffuse de l'agent infectieux dans le cytoplasme de la cellule-hôte nous avons émis l'hypothèse suivante : la gentamicine, antibiotique basique comme la streptomycine, a pu exercer sur la membrane cellulaire une action détergente ; la pénétration de particules infectieuses provenant de l'éclatement d'inclusions mûres dans le milieu de culture s'est peut-être alors effectuée, non pas par phagocytose, mais par effraction de la membrane cellulaire altérée et a été suivie de la multiplication de l'agent directement dans le cytoplasme (*Schéma 5*).

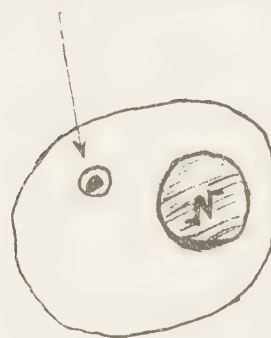
L'importance de la pénétration de l'antibiotique dans la cellule est à souligner. UMBREIT en ce qui concerne la streptomycine constate que cet antibiotique ne pénètre pas dans les cellules de mammifères (174). S'il en est de même pour la gentamicine l'agent du trachome qui est intra-cellulaire ne risque pas d'être atteint par l'antibiotique. Toutefois aux doses élevées telles 500 µg/ml, il est possible que l'antibiotique force les barrières de perméation et arrive en concentration suffisante au sein de certaines inclusions pour y exercer son effet inhibiteur sur la synthèse des protéines, ce qui pourrait expliquer la prépondérance des corps initiaux dans la plupart des inclusions.

Quoiqu'il en soit les doses thérapeutiques étant inutilisables, la seule incidence que cet antibiotique puisse avoir sur les Chlamydiae se situe au niveau des *isolements* de ces agents infectieux à partir des prélèvements conjonctivaux ou uréthraux. En effet les surinfections bactériennes accompagnant le trachome ou les uréthrites à inclusions gênent considérablement les tentatives

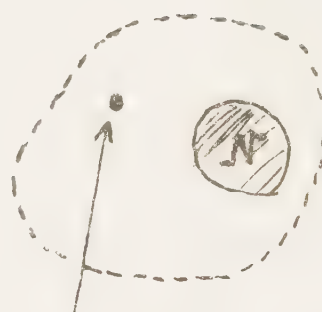
Corps élémentaire



Vacuole de phagocytose



TEMOIN



mébrane altérée

corps élémentaire non enfermé
dans une vacuole

CELLULE + GENTAMICINE

Schéma 5

d'isolement et l'adjonction de fortes doses d'antibiotiques aux cultures cellulaires peut seule venir à bout des germes de surinfection (25 - 145) ; encore faut-il que ces antibiotiques ne gênent pas le développement de l'agent infectieux. Citons pour mémoire les échecs des tentatives d'isolement de l'agent du trachome jusqu'en 1957, tant que les cellules inoculées étaient cultivées en présence de pénicilline destinée à supprimer les contaminants bactériens. L'idée de T'ang de remplacer la pénicilline par de la streptomycine a alors été couronnée de succès. Car la streptomycine à doses modérées, telle 50 µg/ml, qui sont couramment utilisées dans les cultures cellulaires in vitro, ne gêne pas l'évolution de l'agent du trachome ; par contre au cours des isolements les doses utilisées sont souvent proches de 500 µg.

Nous avons examiné le devenir de cet agent en présence de ces doses élevées de streptomycine et selon notre protocole expérimental : il existe peu de modifications (*Planches 31 et 32*) ; les corps élémentaires infectieux sont présents et les corps initiaux sont tout à fait normaux. Signalons toutefois la présence sur certains clichés (*Planche 32 - Fig. 2*) d'une assez grande quantité de corps intermédiaires.

D'autres études sur la streptomycine ou certains aminosides comme la néomycine et la kanamycine ont été effectuées par SOWA et RACE (154) au cours d'isolements de l'agent du trachome en oeufs embryonnés. Le nombre d'isolements après une nuit de contact à 4° des prélèvements conjonctivaux avec les antibiotiques, est beaucoup moins important quand ces antibiotiques sont la framycétine ou la kanamycine que lorsqu'il s'agit de néomycine ou de streptomycine. On voit donc qu'à l'intérieur même du groupe des aminosides les effets sont différents, les auteurs conseillent d'utiliser la streptomycine à la dose de 400 µg/ml.

L'étude du pourcentage d'infection cellulaire selon notre protocole expérimental nous a aussi montré que même avec 500 µg/ml de streptomycine le nombre des inclusions n'était pas affecté.



STREPTOMYCINE	48 ème heure	72 ème heure	96 ème heure
TEMOIN	39 %	42 %	47 %
500 µg/ml	35 %	54 %	61 %

Récemment une étude comparative de l'action de la streptomycine et de la gentamicine sur les isollements a été effectuée par WENTWORTH (193). Sur 343 prélèvements cervicaux et uréthraux ensemencés en cellules Mac Coy irradiées, l'auteur a pu isoler 45 souches de Chlamydiae quand ces cellules étaient cultivées avec 10 µg/ml de gentamicine alors qu'avec les mêmes échantillons cultivés en présence de 50 µg/ml de streptomycine par ml, 32 isollements seulement ont pu être réalisés. Ceci tient au spectre antibactérien plus étendu de la gentamicine qui a évité la souillure d'un certain nombre de tubes de culture par les germes de surinfection présents dans les prélèvements des produits pathologiques et souligne l'intérêt de cet antibiotique au cours d'un travail de laboratoire sur les Chlamydiae.



CHAPITRE V

- LES ENVELOPPES BACTERIENNES -

o o

■

Situées à la périphérie de la bactérie, la paroi et la membrane cytoplasmique exercent un rôle de protection.

Exclusivement rencontrée dans les cellules végétales et chez les bactéries la *paroi* a une constitution chimique variable (52 - 98 - 124). Celle des bactéries à Gram négatif est riche en lipides (20 %) et fournit par hydrolyse tous les acides aminés d'une protéine ainsi que des hexosamines : D-Glucosamine, Acide muramique. Le composé élémentaire de la paroi est le glycosylaminopeptide ou mucopeptide (*schéma 6*). De nombreuses liaisons s'établissent entre plusieurs éléments de mucopeptides voisins constituant ainsi la muréine ou peptidoglycane (*schéma 7*) qui forme un réseau continu dans l'espace et assure la rigidité des parois.

En microscopie électronique la paroi des bactéries a été étudiée par plusieurs auteurs (98 - 118 - 119); elle a l'aspect classique de la "unit-membrane" (142) constituée par la juxtaposition de deux couches denses aux électrons séparées par une couche transparente.

Sa situation étant extra-cellulaire, les constituants précurseurs devront, au cours de la synthèse, (124), traverser la membrane cytoplasmique et se polymériser à l'extérieur. Cette synthèse sera effectuée en trois étapes distinctes survenant en trois sites différents de la cellule bactérienne (*schéma 8*) et est inhibée par la pénicilline.



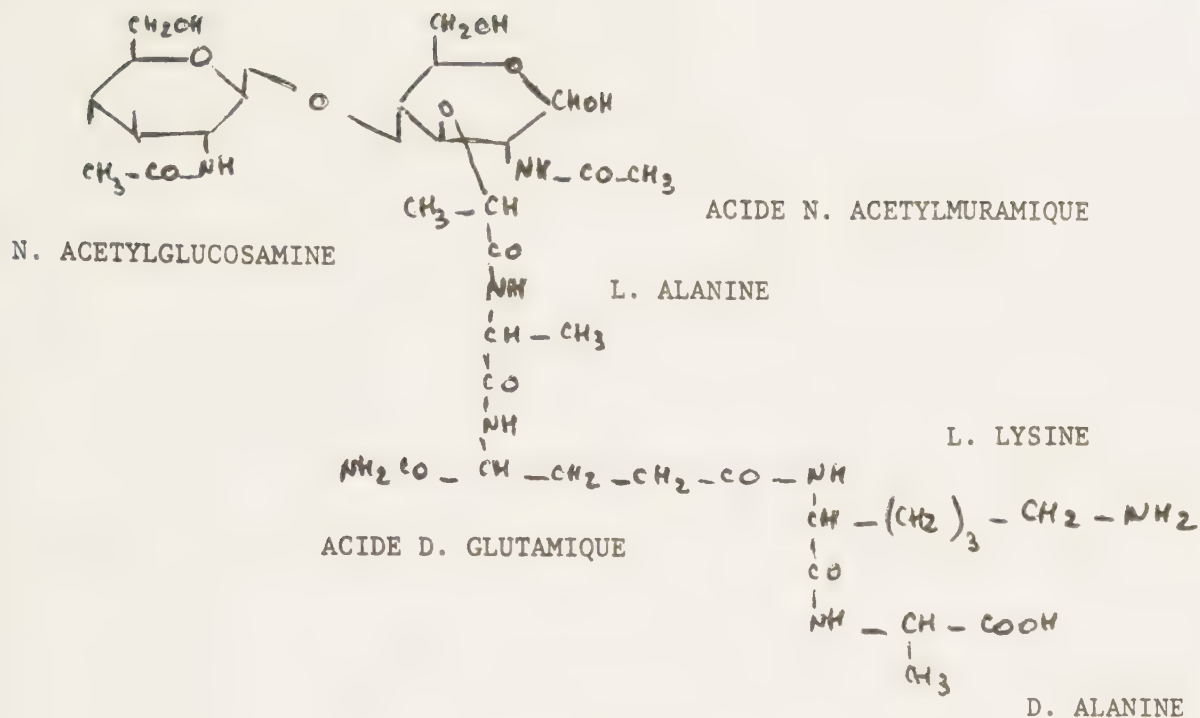


Schéma 6

GLYCOSYLAMINOPEPTIDE

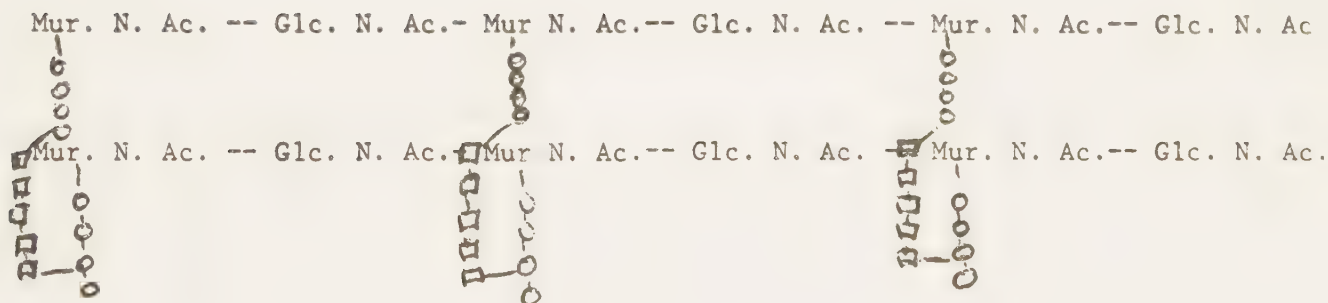


Schéma de la structure du peptidoglycane de la
paroi de *S. aureus* (Strominger)

Schéma 7

MUCOPEPTIDE





Quant à *la membrane cytoplasmique* des bactéries, elle est le support d'un grand nombre d'activités biochimiques (126 - 143). Constituée de phospholipides et de protéines, l'arrangement structural de ces différents composés à l'intérieur de la membrane est encore mal connu (79). Le rôle essentiel de la membrane cytoplasmique est celui de barrière de diffusion ; elle joue un rôle fondamental dans l'économie cellulaire car son imperméabilité s'oppose à la sortie des constituants cellulaires et à l'envahissement du cytoplasme par les molécules du milieu extérieur ; toutefois elle permet les échanges nécessaires de substances entre le milieu extérieur et le milieu intra-cellulaire, la diffusion à travers la membrane pouvant se faire de deux manières, soit passivement, soit activement grâce aux perméases.

Sa structure est désorganisée par les polymyxines.



I. PENICILLINE.

La pénicilline a été découverte par FLEMING en 1928 mais son utilisation thérapeutique n'a été effective qu'à partir de 1944. Obtenue à partir des bouillons de culture de différents *Penicillium*, d'importants travaux de chimie ont été entrepris sur cette substance antibiotique qui ont abouti à sa synthèse complète en 1957 ; mais celle-ci ne sera suivie d'aucune application pratique jusqu'au jour où l'on découvrit l'intermédiaire-clé, l'acide 6-aminopénicillanique, noyau de la pénicilline (*Fig. 13*).

A partir de cette date de nombreuses pénicillines seront synthétisées. Pénicillines semi-synthétiques toutefois car le noyau de base est toujours produit par la fermentation des bouillons de culture de *Penicillium*, sur lequel viennent se greffer des chaînes latérales vraiment synthétiques destinées à améliorer l'utilisation de l'antibiotique : résistance à la destruction par les sucs digestifs pour obtenir une pénicilline orale par exemple, ou résistance accrue à la destruction par la pénicillinase des bactéries possédant cet enzyme.

Les bases biochimiques du mécanisme d'action de la pénicilline ont été posées par PARK et STROMINGER (128) ; ces auteurs établissent des relations entre les nucléotides d'uridine accumulés au cours de l'inhibition de croissance du staphylocoque par la pénicilline et la nature chimique de la paroi de ce germe. Le mécanisme sera précisé plus tard par les travaux de STROMINGER (157 - 170).

Ces travaux ont montré que les ponts interpeptides avaient un rôle important dans la structure de la paroi. Leur branchement est réalisé dans la dernière étape de la synthèse de la paroi au cours d'une réaction de *transpeptidation* catalysée par une transpeptidase, qui est le site d'action de la pénicilline. Cette réaction consiste à établir une liaison peptidique entre les deux chaînes pentapeptidiques de deux glycosyl-aminopeptides. Cette liaison se fait directement chez *E. coli*, ou par l'intermédiaire d'un chaînon pentaglycocolle



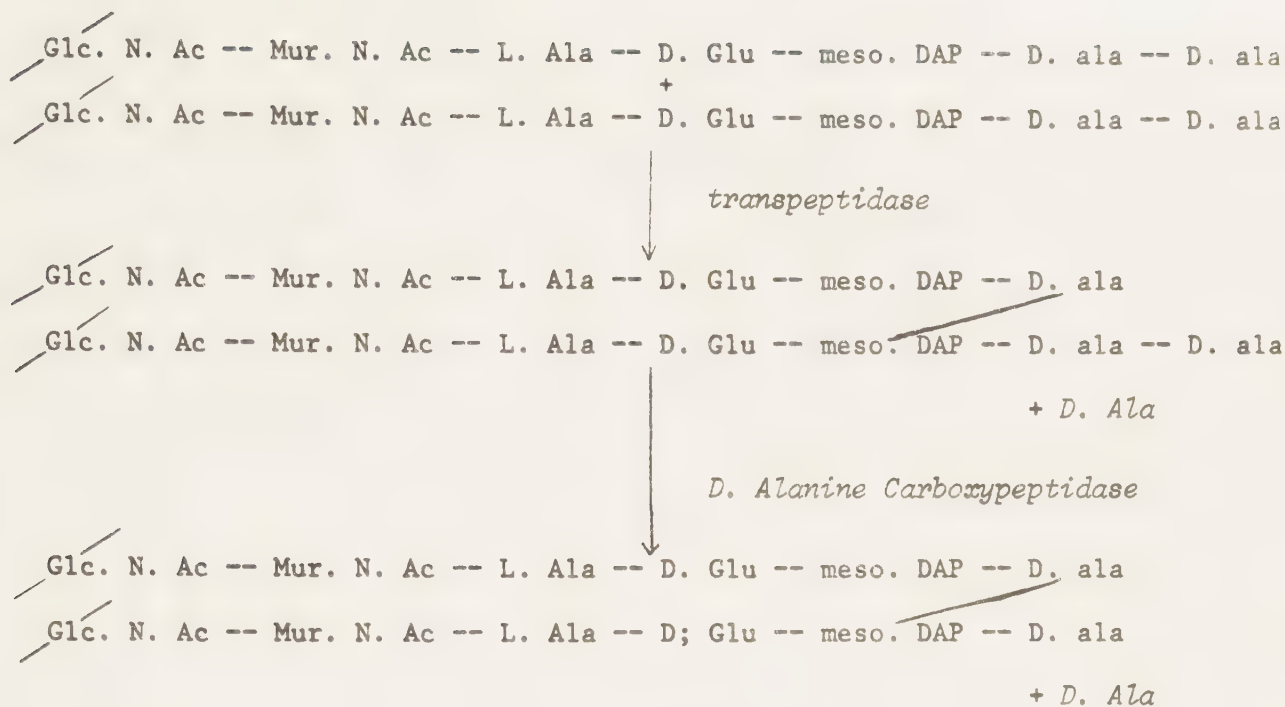


Schéma 9

TRANSPEPTIDATION

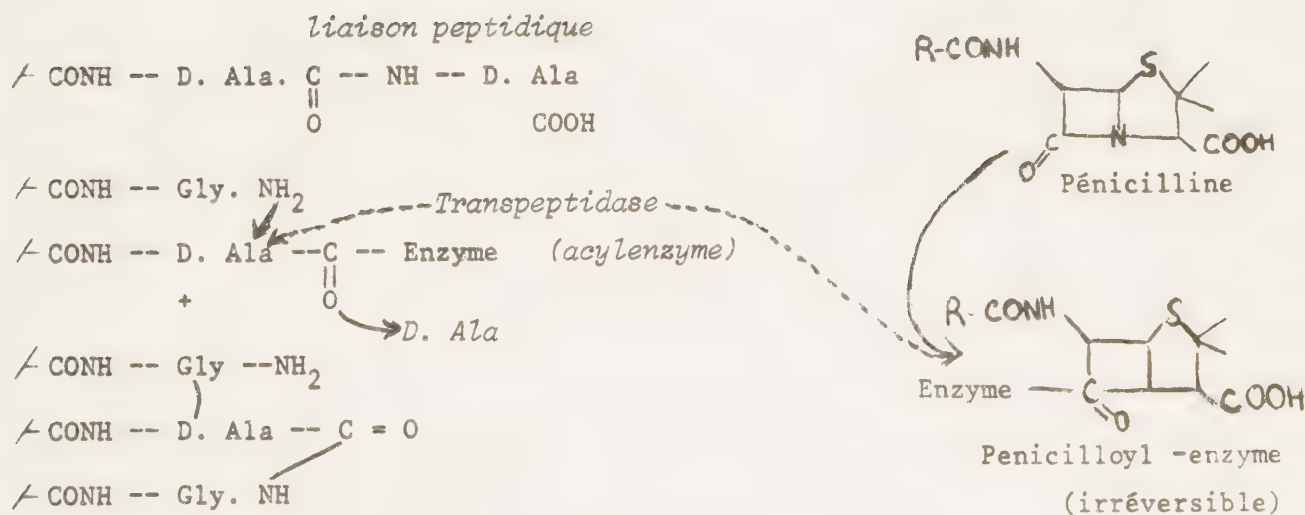
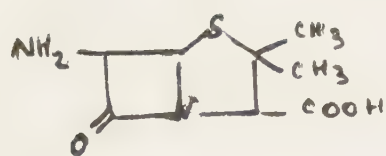


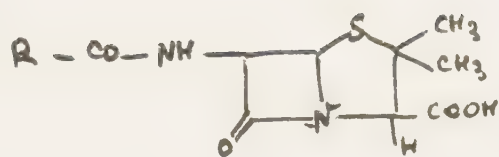
Schéma 10

MECANISME PROPOSE POUR L'INHIBITION DE LA TRANSPEPTIDATION
PAR LA PENICILLINE (S. aureus)



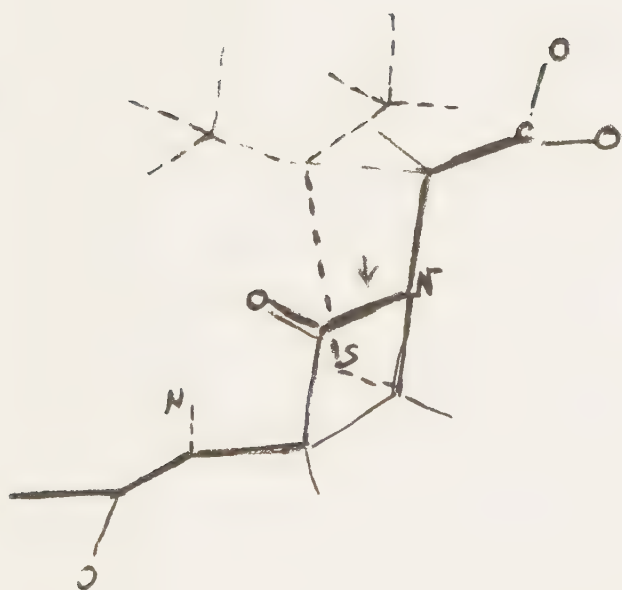


Ac. 6. AMINO. PENICILLANIQUE



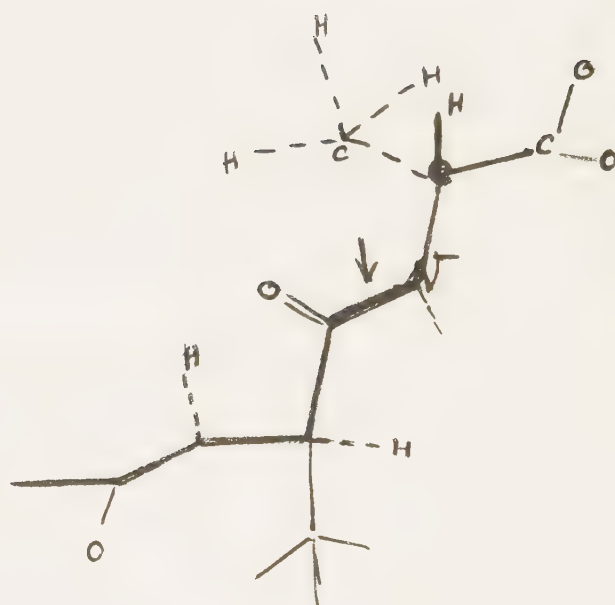
P E N I C I L L I N E

Fig. 13



P E N I C I L L I N E

Fig. 14



D. ALANYL. D. ALANINE

Fig. 15



chez S. aureus. Chez E. coli la liaison se fait directement entre une fonction amine libre de l'acide diaminopimélique et une fonction carboxyle de l'avant dernier D-alanine. La transpeptidation implique l'intervention de deux enzymes, une transpeptidase et une D-alanine carboxypeptidase (schéma 9).

Des hypothèses suggérant une similitude conformationnelle entre la pénicilline et une partie du peptidoglycane ont été formulées. TIPPER et STROMINGER comparant les modèles de la partie terminale du pentapeptide et de la pénicilline en concluent que ces molécules ont une conformation analogue (132 - 170) :

- la pénicilline possède, dans son cycle β -lactame, une liaison $C = N$ de haute réactivité dont la conformation est analogue à l'une des conformations prise par le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine. (Fig. 14 et 15).

- la transpeptidation se fait aux dépens de la liaison peptidique D-ala-D-alanine, il est possible que la transpeptidase fasse un complexe avec le D-ala-D-alanine puis une acyl-enzyme transitoire avec élimination de la D-alanine terminale (schéma 10).

- la pénicilline pourrait par sa conformation analogue, former le complexe avec la transpeptidase, puis une acyl-enzyme de façon irréversible.

L'efficacité de la pénicilline n'existe que si l'anneau lactame est intact. Ce schéma du mode d'action rend compte des effets généraux exercés par la pénicilline.

Les bactéries traitées par la pénicilline ne synthétisent plus une paroi normale ; si le milieu dans lequel on effectue ces expériences contient une forte concentration en saccharose et des ions Mg^{++} ces bactéries ne se lysent pas : elles continuent à croître et leur aspect devient différent. Elles forment des sphéroplastes ou des protoplastes, dont la paroi est incomplète, mais continuent toutes les opérations métaboliques d'une bactérie normale. Par contre une



diminution de la pression osmotique provoque leur éclatement.

Dès 1950, WEISS rapportait l'action positive de la pénicilline sur les agents du groupe psittacose-lymphogranulomatose vénérienne (185), chez lesquels il observait l'existence de grosses particules de formes irrégulières, vacuolisées et ne se divisant plus. Depuis, de nombreux travaux ont suivi tant en microscopie photonique qu'en microscopie électronique, portant toutefois essentiellement sur Chlamydia psittaci (63 - 101 - 110 - 158 - 162).

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

L'examen des cellules en microscopie photonique révèle d'emblée des *modifications morphologiques* et ceci même avec 0,5 unité de pénicilline par ml.

A la 48^{ème} heure du cycle, presque toutes les inclusions, qui sont restées 24 heures en présence de pénicilline, sont atteintes. Rares sont celles qui possèdent des particules normales, violet-pourpre, éparpillées au sein de leur vacuole, sans modifications. La majorité des inclusions est de taille moyenne et renferme des *particules dont la grosseur est inégale*, très variable : certaines sont petites parfaitement sphériques, violet-pourpre et leur aspect normal les font identifier à des corps élémentaires ; d'autres sont plus grosses, leur taille atteint 1 μ m, ou davantage, ont un aspect soufflé, et leur teinte varie du rose au bleu. La présence simultanée de ces particules de taille inégale, réalisant un mélange hétérogène à l'intérieur d'une même inclusion est une des caractéristiques de l'aspect de ces lames (Planche 33 - Fig. 2). Les particules les plus grosses, que nous appellerons *corps géants*, sont déformées ; souvent leur forme n'est pas entièrement sphérique, mais une partie de leurs contours est aplatie, accolée à une particule voisine, leur donnant une forme poly-



gonale ; seul le contour libre sur le bord de l'inclusion conserve une forme convexe.

D'autres inclusions renferment exclusivement des corps géants, soufflés, pressés les uns contre les autres et déformés ; ces corps nettement distincts peuvent facilement être dénombrés. Leur teinte est variable : certains sont roses, mauve-pâle, d'autres sont bleu-foncé presque noirs et cette hétérochromasie à l'intérieur d'une même inclusion est une autre caractéristique de l'aspect de ces inclusions.

Mais de très nombreuses inclusions ne contiennent qu'un ou deux corps géants (*Planche 33 - Fig. 1*) dont la taille peut atteindre 2 μ m et la teinte est bleue très foncée. La répartition tinctoriale n'est pas uniforme, les bords sont plus colorés, ourlés d'une frange bleue très foncée presque noire, alors que le centre est plus clair, creusé d'une dépression. Quant il n'existe que deux corps à l'intérieur de l'inclusion, ils sont souvent très proches l'un de l'autre et réalisent une sorte d'image en diplocoque.

A la 72^{ème} heure du cycle, les modifications supplémentaires portent sur les corps géants ; certains atteignent 4 μ m, leur teinte est toujours bleu-noire, irrégulièrement répartie à la surface du corps et creusée d'une dépression de plus en plus claire. Quelques uns ont une forme irrégulière et sont déchiquetés sur les bords, rétractés.

A la 96^{ème} heure du cycle, leur taille a encore augmenté et nous avons pu en observer dont la taille avoisinait 6 μ m ; leur forme était souvent irrégulière, soit rétractée en croissant, soit ovale et souvent la dépression centrale était remplacée par une cavité.



2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

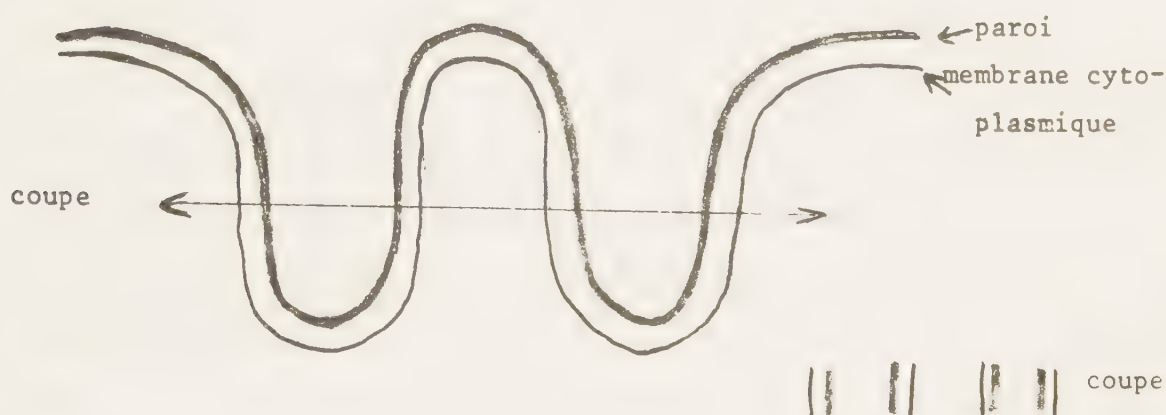
Les inclusions les plus fréquemment rencontrées sont de taille moyenne contenant des particules de grosseurs inégales ; le type en est l'inclusion présentée sur la Fig. 3 de la planche 33 où 4 ou 5 corps géants sont mêlés à quelques corps élémentaires. Ces corps géants accolés les uns aux autres présentent à leur surface de contact des contours aplatis. Deux d'entre eux situés à proximité de corps élémentaires montrent même une dépression traduisant la malléabilité des enveloppes de ces corps comparativement à la rigidité de celle des corps élémentaires. La paroi, nettement distincte sur ces corps géants, est quelquefois doublée par une bande de cytoplasme très fine, décollée de la masse cytoplasmique. Des bourgeons, nombreux et petits, sont issus du cytoplasme. La répartition des ribosomes paraît normale sur la plupart des corps initiaux, mais l'un d'entre eux situé sur la partie droite du cliché laisse apparaître un cytoplasme éclairci, filamenteux, contenant peu de granulations ribosomales si ce n'est à la périphérie, concentrées en un fin liseré. Un autre corps initial situé dans la partie inférieure droite du cliché est comprimé entre un corps initial et des corps élémentaires dont l'aspect est anormal. De nombreux systèmes membranaires sont accumulés à l'intérieur de la vacuole d'inclusion. Quelques corps élémentaires sont présents, de taille normale. Certains corps dont la taille est celle d'un corps initial, sont anormaux et possèdent un cytoplasme fragmenté en mottes irrégulières, les unes très denses aux électrons les autres plus claires, et ne présentant que des granulations ribosomales.

Très souvent ces corps géants sont déformés, leur cytoplasme est rétracté en croissant (Planche 34) et leurs membranes s'effilochent, se dédoublent et forment des replis, des cercles membranaires, dont l'accumulation à l'intérieur de la vacuole est abondante. Ce qui frappe beaucoup c'est l'extrême facilité que possèdent ces corps à se déformer ; le cytoplasme paraît très malléable. Les

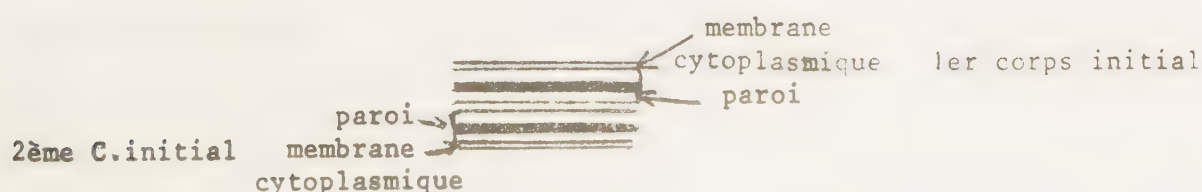


bourgeons et languettes cytoplasmiques sont très abondants.

Souvent monstrueux et vacuolisés, les corps forment des invaginations comme on peut le voir sur la figure 2 de la planche 35 ; la coupe de ce corps montre bien les deux masses cytoplasmiques bordées de leur paroi selon le schéma suivant :



La paroi de ce corps géant semble, à la partie supérieure du cliché, plus épaissie. Un fragment de paroi grossi (Planche 35 - Fig. 41), permet en fait de distinguer en plusieurs endroits quatre bandes denses aux électrons séparées par trois zones claires, les deux bandes denses du centre paraissant quelquefois beaucoup plus serrées l'une contre l'autre que les bandes externes. Plus au-dessous se situe la membrane cytoplasmique pourvue elle aussi de ces deux lignes denses aux électrons séparées par une zone claire du type "unit-membrane" et au-dessus, une autre membrane du même type. Il s'agit en fait de la juxtaposition des parois et membranes cytoplasmiques de deux corps initiaux très altérés. Cette juxtaposition survenant comme il suit :





L'étroit accolement des parois des deux corps initiaux entraîne l'observation au microscope électronique à faible grossissement d'une ligne très dense aux électrons qui ne peut être différenciée qu'après grossissement. Et cet étroit accolement est le témoin de la très grande plasticité des membranes de ces corps.

Certaines inclusions ne contiennent qu'un seul corps initial de taille géante (*Planche 36*). L'un d'eux (*figure 1*), seul dans sa cavité vacuolaire montre des contours festonnés où la paroi semble inexistante en certains endroits. Des petites vacuoles apparaissent sur le bord de ce corps. Au centre une masse cytoplasmique s'individualise. La vacuole renferme des vésicules membranaires. La *figure 2* montre encore deux corps géants accompagnés de nombreux replis membranaires. Un troisième corps, difficilement identifiable car très désorganisé, est visible sur la partie supérieure droite du cliché. La membrane de ce corps très déformée s'invagine par endroit, se rompt en d'autres et le cytoplasme se désagrège. Le corps manifestement s'achemine vers la lyse.

Ce cliché pris sur des coupes de cellules cultivées en présence de 50 unités/ml de pénicilline montre également à la périphérie de l'inclusion des mitochondries gonflées.

La *planche 37* nous permet d'observer deux corps géants creusés de vacuoles de forme ovale et dont l'aspect en microscopie photonique nous donnerait sûrement l'image de diplocoque. La paroi n'existe plus en certains endroits. Des excroissances membranaires sont visibles sur la vacuole interne de l'un des corps et sur une mini-cellule située à proximité de l'un d'eux. La formation de ces mini-cellules en présence de pénicilline a déjà été rapportée par TANAMI chez Chlamydia psittaci (166). Une ligne de condensation, circulaire, dense aux électrons, peut être aperçue à l'intérieur du cytoplasme de celui-ci. De telles images de condensation ont également déjà été décrites par MATSUMOTO sur Chlamydia psittaci dont la croissance s'était effectuée en présence de pénicilline (101).



3. DISCUSSION

Dès 1958, les modifications ultra-structurales de l'agent du trachome sous l'influence de la pénicilline ont été étudiées par MATSUBARA et MITSUI (99) dans le but de préciser la nature virale ou bactérienne de cet agent dont les limites à cette époque étaient mal définies. Plus récemment des études ont été entreprises sur d'autres Chlamydiae ; entre autres *Chlamydia psittaci* par MATSUMOTO, TAMURA et MANIRE (101 - 102 - 158 - 162) et sur l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne par ARMSTRONG et REED (5). Tous aboutissent aux mêmes résultats : l'obtention de corps géants et vacuolisés, identiques à ceux que nous avons pu observer.

La division des particules est entravée et aucune fission binaire n'a pu être rencontrée. Les nombreuses inclusions ne contenant qu'un seul corps géant, ou deux quelquefois quand la division d'un corps a eu le temps de se réaliser pendant les 24 heures précédant l'addition des antibiotiques, en témoignent. D'autres inclusions plus précoces, renferment quand même des corps élémentaires dont l'évolution complète s'est effectuée sans doute parce qu'ils se trouvaient à un stade avancé lors de l'addition de la pénicilline. Toutefois ils sont rares et la majorité des particules est représentée par les *corps géants*.

Ceux-ci prennent en microscopie photonique, *une teinte bleue très foncée*, quasiment noire, témoignant de l'abondance des acides ribonucléiques. En effet si la synthèse de la paroi est inhibée dans sa dernière étape, par contre les métabolismes des acides ribonucléiques et des acides désoxyribonucléiques continuent pendant un certain temps à un rythme normal.

Toutefois certains corps sont roses témoignant par contre de la prépondérance d'ADN. Quoiqu'il en soit, la présence simultanée et nettement visible en microscopie photonique de particules de teintes différentes, est fréquemment rencontrée dans ces inclusions.

L'infection cellulaire n'est pas diminuée et il semble que les inclu-



sions aient simplement été ralenties dans leur évolution comme le montre le tableau suivant :

PENICILLINE	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H *	48 H *	72 H *
TEMOIN	51 %	29 %	35 %
0,5 µg/ml	9,3 %	18 %	-
5 µg/ml	14,3 %	24 %	29 %
50 µg/ml	24 %	39 %	42 %
500 µg/ml	12 %	28 %	33 %

*Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.

En microscopie électronique deux autres phénomènes sont fréquents : il s'agit du *bourgeonnement* cytoplasmique très intense et de l'accumulation de *systèmes membranaires* au sein de l'inclusion. Il existe une multitude de petits cercles membranaires qui se détachent des parois, comme on le voit sur la *planche 34*, et s'accumulent dans l'inclusion. Il semble que cette paroi ne soit pas maintenue, ondule, s'enroule et finisse par se détacher.

La *malléabilité* très importante des *corps géants* est bien mise en évidence par l'extrême facilité de déformation que possèdent ces corps. Pressés les uns contre les autres, leurs contours s'aplatissent et prennent une forme polygonale. Les parois de deux corps proches s'accolent véritablement l'une à l'autre donnant l'impression fausse que ces parois sont épaissies. Ces images traduisent l'absence de rigidité de la paroi due à l'inhibition par la pénicilline du branchement des ponts interpeptides. Le cytoplasme n'est absolument plus maintenu et de nombreuses distorsions surviennent.

La pénicilline agit sur les Chlamydiae comme sur les autres bactéries, entraînant la formation de sphéroplastes mais ceux-ci sont à l'abri du choc osmo-



II. COLISTINE.

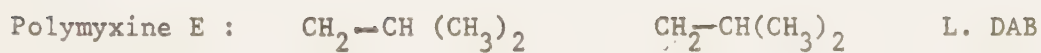
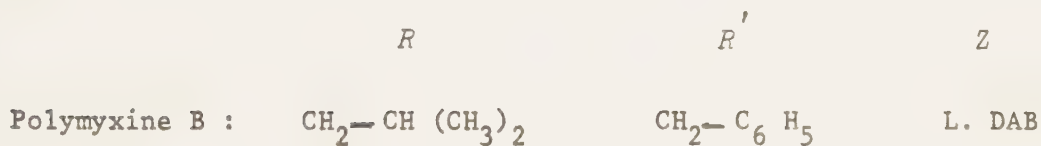
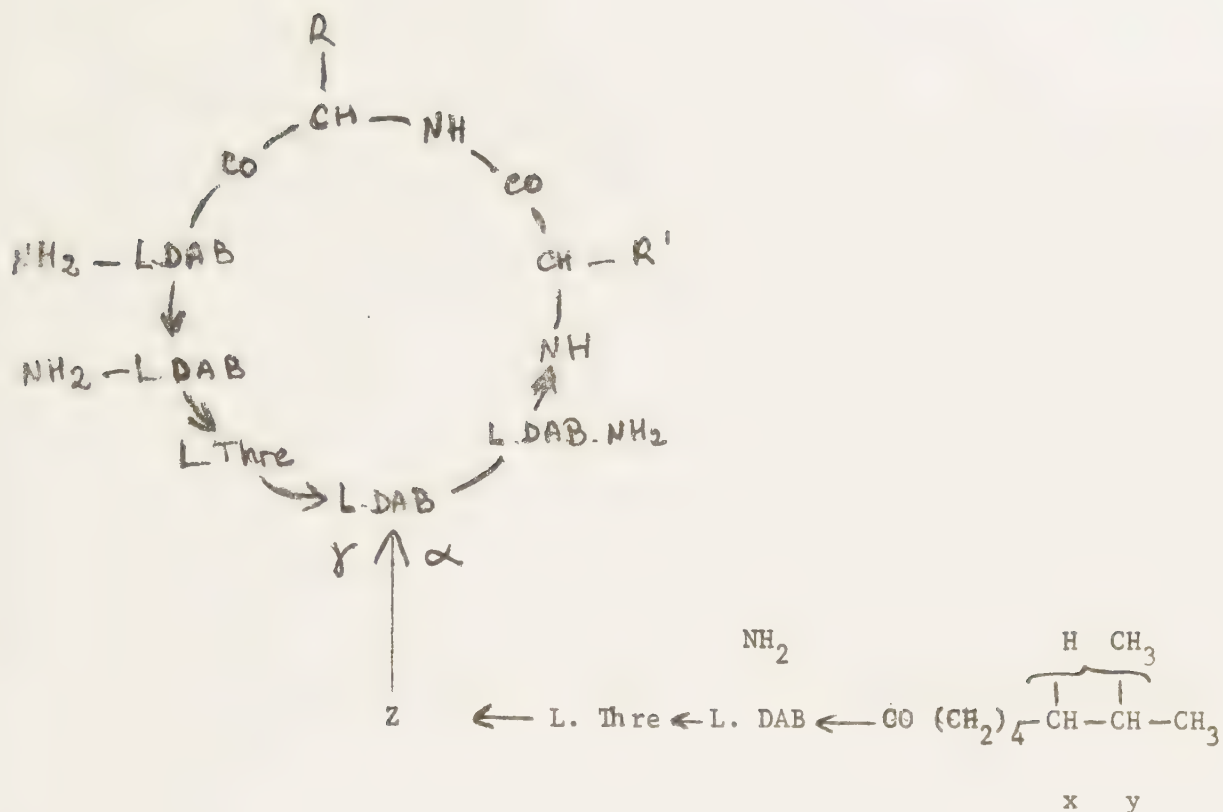
Découverte en 1950 dans les cultures d'un bacille sporulé isolé au Japon, Bacillus colistinus, la colistine est un antibiotique polypeptidique. A la même époque, en Amérique et en Angleterre, deux équipes de chercheurs isolaient à partir d'autres bacilles sporulés, Bacillus polymyxa et Bacillus aerosporus, des substances antibiotiques qu'ils dénommaient respectivement polymyxines et aerosporines. La similarité des deux bacilles fut reconnue ultérieurement : les substances produites étaient donc les mêmes et furent appelées polymyxines.

Les analyses chimiques entreprises plus tard sur ces différents antibiotiques montrèrent leur parenté chimique et la colistine fut rattachée au groupe des polymyxines (121) car sa composition chimique est presque identique à celle de la polymyxine E (schéma 11).

L'hydrolyse acide des polymyxines fournit d'une part des acides gras, acide méthyl 6 ou méthyl 7-octanoïque et des acides aminés dont une forte proportion est basique : (L) acide diamino butyrique, D ou L-leucine, L-leucine, L-thréonine ; une partie de la chaîne peptidique se trouve sous forme cyclique. On connaît actuellement plusieurs polymyxines ; A, B, C, D, E et M ; quant aux polymyxines B, D et E ainsi que la colistine ce sont encore des mélanges de composés qui diffèrent par la nature de leur acide gras : acide méthyl 6 ou méthyl 7-octanoïque. Les composés les plus utilisés en thérapeutique sont la polymyxine B et la colistine ; ne contenant aucune fonction carboxyle libre ces antibiotiques sont très basiques. Ils sont porteurs d'une charge positive à pH neutre et leur action est à rapprocher de celle des détergents cationiques dont ils diffèrent cependant par leur action élective sur les bactéries à Gram négatif.

La colistine se fixe sur les sites anioniques de la membrane, à savoir le groupement phosphorique des phospholipides, et provoque une désorientation des lamelles lipoprotéiques suivie d'une désorganisation complète de la barrière





Dans chaque cas le méthyle de l'acide gras peut être soit en position x soit en position y fournissant l'acide méthyle 6 ou méthyle 7 octanoïque

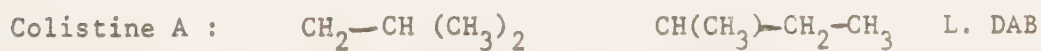


Schéma 11

P O L Y M Y X I N E S



osmotique que constitue la membrane. Il en résulte une fuite importante de matériel cellulaire (pentose - phosphate - N protéique) dans le milieu extérieur ce qui entraîne la mort bactérienne.

D'autre part il existe une action secondaire de la colistine qui consiste en l'inhibition des processus respiratoires dont la membrane est le support (129).

La colistine est donc un antibiotique bactéricide dont l'effet aboutit à la lyse des bactéries, lyse qui peut être observée par photométrie. Son action est rapide et s'exerce à des concentrations très voisines des doses bactériostatiques. A titre d'exemple cette dose chez E. coli n'excède pas 3 µg de colistine base par ml.

1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Peu de modifications ont été observées. Il n'existe aucune différence entre les inclusions présentes dans les tubes témoins et celles des tubes de réaction. Le parasitisme cellulaire est aussi important dans les uns que dans les autres comme le montre le tableau suivant :

COLISTINE	POURCENTAGE D'INCLUSIONS APRES DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT AVEC L'ANTIBIOTIQUE		
	24 H *	48 H *	72 H *
TEMOIN	19 %	24 %	30 %
0,5 µg/ml	15 %	24 %	32 %
5 µg/ml	17 %	9 %	33 %
50 µg/ml	15 %	56 %	34 %
500 µg/ml	4 %	30 %	20 %

* Ces temps correspondent respectivement aux 48ème, 72ème et 96ème heures du cycle.



A la 96ème heure, le pourcentage de cellules infectées est identique dans presque tous les tubes sauf en ce qui concerne la dose la plus élevée, 500 $\mu\text{g/ml}$, où l'on constate une légère diminution du pourcentage de l'infection cellulaire qui s'élève à 20 %. Il faut toutefois signaler que sur cette lame un grand nombre de cellules s'est décollé.

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Quelques modifications sont à relever, en présence des concentrations d'antibiotiques les plus élevées ; en effet les inclusions rencontrées dans les cellules ayant cultivé en présence de 0,5 et 5 $\mu\text{g/ml}$ de colistine sont tout à fait *normales* ; elles sont arrivées à maturité et contiennent les trois types de particules (*Planche 38*).

Par contre, en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$, les corps initiaux d'un grand nombre d'inclusions présentent des parois assez laches, décollées du cytoplasme et celui-ci bourgeonne facilement (*Planche 39*). Sur la partie gauche du cliché, il existe en dehors de l'inclusion, une particule qui semble être un corps initial dans une vacuole dont la membrane est très épaisse.

Ces images de membrane épaissie ont d'ailleurs été retrouvées sur d'autres clichés (*Planche 40 - Fig. 1*) : des particules isolées dans le cytoplasme cellulaire sont entourées d'un système membranaire à plusieurs feuillets ; l'un d'eux est interrompu sur une portion de cercle ; une mitochondrie étirée, s'acole à l'ensemble. A proximité de ces particules, une petite inclusion ne contient que des corps initiaux dont les parois et membranes sont très distinctes ; le cytoplasme de ces corps tend à se vacuoliser en bordure de la membrane cytoplasmique réalisant une image "en anse de panier". Des mitochondries paraissent altérées et se déversent dans l'inclusion (*Planche 40 - Figure 1*).

Quant aux inclusions trouvées dans les cellules cultivées avec 500 $\mu\text{g/ml}$ de colistine, elles présentent le même genre de modifications : corps initiaux



dont le cytoplasme, quelquefois déformé, rétracté, bourgeonne (*Planche 41 - Figure 1*) ou se creuse en "anse de panier" comme on peut le voir sur la figure 2 de la planche 40; les mitochondries sont altérées, vacuolisées.

Des figures lysosomales très denses aux électrons ont assez souvent été rencontrées sur les coupes (*Planche 41 - Figure 2*).

Toutefois même à 500 µg/ml nous avons pu constater qu'il existe des inclusions quasiment normales, contenant les trois types de particules (*Planche 42 et 43*) où seuls quelques corps initiaux présentent des anomalies cytoplasmiques.

3. DISCUSSION.

A la suite de ces résultats nous pouvons dire que la colistine est sans intérêt dans la thérapeutique du trachome ; aucune diminution du pouvoir infectieux n'a été constaté, ni aucune modification structurale valable.

Nous sommes amenés à comparer ces résultats avec ceux obtenus par MATSUMOTO (100) lors d'une expérience faisant intervenir la polymyxine B sur des particules purifiées de Chlamydia psittaci. Cet auteur a utilisé la polymyxine B à raison de 10 000 Unités/ml, ce qui équivaut à 1 000 µg puisque 1 unité de polymyxine B = 0,1 µg, et a constaté la formation de projections de 20 à 40 nm à la surface, des particules ; ces projections étaient supprimées par l'action du dodecyl sulfate de sodium ce qui suggère leur nature lipidique.

Si l'antibiotique - à fortes doses il est vrai - agit sur les particules isolées mais reste sans action quand elles sont à l'intérieur de la cellule, il est vraisemblable que cette inactivité est due à un manque de pénétration de l'antibiotique dans la cellule-hôte. Quand les doses s'élèvent une certaine quantité d'antibiotique doit pénétrer de force comme le prouvent les modifications observées au niveau de certaines mitochondries (*Planche 40 - Figure 1*) dont les membranes sont altérées et qui se déversent dans l'inclusion et établissent des



contacts étroits avec les corps initiaux.

Quant aux formations en "anse" assez fréquemment trouvées dans le cytoplasme bactérien nous ne savons à quoi les attribuer car de telles formations ont également été rencontrées en présence de 500 µg/ml de streptomycine (*Planche 31 - Figure 1*) ou de sulfafurazole (*Planche 11 - Figure 1*) et ne sont donc pas spécifiques.

Quoiqu'il en soit, l'action de la colistine sur les Chlamydiae n'est pas à retenir et n'a aucune application pratique, même au cours d'isolements à partir de produits pathologiques ; en effet son spectre sélectif sur les bactéries à Gram négatif ne lui donne aucun avantage sur d'autres antibiotiques agissant à la fois sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, tels les aminosides.

Il faut signaler que le manque d'activité de cet antibiotique dans le traitement des Rickettsioses a également été rapporté par GIROUD et CAPPONI (51).



- CONCLUSIONS GENERALES -

° °
□

Le but de notre travail était d'étudier les modifications ultrastructurales subies par l'agent du trachome sous l'influence de différents antibiotiques. Parasite intra-cellulaire obligatoire cet agent présente un cycle de croissance au cours duquel apparaissent trois types de particules dont le rôle et l'ordre de succession ne sont pas encore très clairs. Dans le but d'élucider quelques uns de ces mécanismes il nous a paru intéressant d'utiliser des antibiotiques dont le point d'impact sur la cellule bactérienne était connu. Parallèlement à l'étude ultrastructurale une étude en microscopie photonique était réalisée permettant de compter le nombre d'inclusions formées en présence des antibiotiques. Ces derniers ont été ajoutés aux cultures cellulaires infectées depuis 24 heures afin d'essayer de reproduire in vitro les conditions rencontrées en clinique quand il s'agit de soigner un sujet trachomateux. Différentes doses d'antibiotiques ont été utilisées : les unes faibles, 0,5 µg/ml et 5 µg/ml, les autres plus élevées, 50 µg/ml et 500 µg/ml. En microscopie photonique nous avons suivi l'évolution de l'agent jusqu'à la 96 ème heure alors qu'en microscopie électronique nous avons décidé d'effectuer les prélèvements à la 72 ème heure, qui correspond à la fin du cycle de cet agent.

Différents résultats ont été obtenus dont voici un bref rappel :

- la première substance étudiée, le *sulfafurazole*, provoque la formation de corps géants, surchargés en acides ribonucléiques, souvent boursoufflés,



altérés et qui ne se divisent pas. A côté de ces particules géantes des corps initiaux et des corps élémentaires nombreux existent.

- la *rifamycine SV* diminue considérablement l'infection cellulaire.

Parmi les rares inclusions qui ont pu être rencontrées quelques unes sont normales mais la plupart contiennent des corps initiaux altérés dont le cytoplasme est clairsemé, filamenteux et pauvre en ribosomes ; des corps élémentaires *normaux* persistent.

- de même le *chloramphénicol* diminue très nettement l'infection cellulaire. La plupart des inclusions ne contiennent que des corps initiaux ; leur taille est normale mais bon nombre d'entre eux sont fortement chargés en granulations ribosomales. Des fissions anormales sont fréquemment rencontrées sur les clichés.

- la *gentamicine* est sans action aux doses thérapeutiques, et même aux doses élevées la plupart des inclusions sont normales. Toutefois certaines d'entre elles sont constituées de corps initiaux géants dont la multiplication semble s'être effectuée de façon diffuse dans le cytoplasme car elles ne sont pas entourées de limites vacuolaires.

- l'addition de *pénicilline* entraîne l'apparition dans toutes les inclusions de particules géantes dont les parois sont très malléables ; ces corps initiaux géants qui ne se divisent pas coexistent avec des corps élémentaires normaux.

- quant à la *colistine* dont le point d'impact est la membrane bactérienne son action est nulle sur cet agent.

De cet examen ultrastructural nous retiendrons deux points sur lesquels nous insisterons :

- les modifications atteignent surtout les corps initiaux et consistent



essentiellement en un blocage de leur division.

- De nombreuses figures lysosomales existent dans les cellules-hôtes ayant cultivé avec certains antibiotiques.

En effet, les substances que nous avons étudiées sont généralement inhibitrices de synthèses bactériennes c'est-à-dire qu'elles exercent leur action sur des germes en phase exponentielle de croissance, qui se multiplient, mais restent sans effet sur les germes arrivés en phase de repos. En appliquant ces données de microbiologie générale aux particules qui apparaissent au cours du cycle de croissance de l'agent du trachome nous avons pu constater que seuls les *corps initiaux* présentaient des *modifications* alors que les corps élémentaires étaient normaux. Ces constatations viennent confirmer que le corps initial représente la forme active de multiplication de l'agent alors que le corps élémentaire constitue la particule arrivée en phase de repos ; il nous paraît donc logique dans ce cas que l'essentiel des modifications observées en présence des antibiotiques porte sur les corps initiaux.

La plupart de ces modifications portant sur la division cellulaire, nous rappellerons succinctement les connaissances que nous avons sur la division de la cellule bactérienne. Ce phénomène représente l'aboutissement d'une succession d'évènements qui visent à reformer deux cellules-filles identiques à la cellule-mère : le génome doit se répliquer entièrement afin que chaque cellule-fille contienne l'information génétique maternelle initiale qui se répartira dans deux protoplasmes séparés ultérieurement par les enveloppes bactériennes. Ainsi la réplication de l'ADN s'accompagne de la croissance de la cellule qui lorsqu'elle aura atteint une taille suffisante sera séparée par une membrane et une paroi nouvellement formée. Le processus de division proprement dit comporte au moins trois stades (144) :



- la séparation des protoplasmes par une membrane cytoplasmique.

- la synthèse d'une paroi sur la membrane et il est vraisemblable qu'à ce stade des enzymes lytiques interviennent pour séparer les chaînes mucopeptidiques de la paroi existante et permettre l'accroissement de cette paroi par le branchement d'autres éléments mucopeptidiques.

- enfin la séparation proprement dite.

Chez les bactéries à Gram positif ces trois stades se succèdent lentement et sont facilement visibles sur les coupes de microscopie électronique, tandis que chez les bactéries à Gram négatif ce processus doit être plus rapide et est plus difficilement visible ; mais il n'en existe pas moins, comme cela a été montré chez E. Coli : en effet le plus souvent la division de ce germe apparaît comme une constriction simultanée des deux enveloppes sans que des septae soient formés ; toutefois leur existence a été prouvée par STEED et MURRAY, cités par ROWBURY (144).

Chez les Chlamydiae, bien que la plupart des images de division de corps initiaux montrent une constriction médiane des deux enveloppes en même temps provoquant la séparation des deux cellules-filles, la formation membranaire n'en existe pas moins. Elle est rarement visible mais plusieurs auteurs ont pu l'observer (81 - 39). Nous mêmes (*Planche 5 - Fig. 2*) avons constaté l'amorce d'un septum membranaire alors que la paroi est intacte sur un corps initial en division. Mais de tels systèmes membranaires ont pu être observés à une fréquence non négligeable dans les corps initiaux dont la croissance s'est partiellement effectuée en présence de chloramphénicol (*Planche 21 - Fig. 1 - Planche 22 - Fig. 1 - Planche 23 - Fig. 2*). Si l'on se réfère au processus de division tel que nous l'avons rapporté plus haut il semble que dans ce cas la séparation des protoplasmes par une membrane cytoplasmique a pu s'effectuer alors que la paroi est restée intacte ; ceci pourrait peut-être s'expliquer par le fait que des



enzymes lytiques nécessaires à l'attaque de la paroi existante n'ont pu être synthétisés par suite de l'addition du chloramphénicol qui bloque la synthèse des protéines et il faudrait admettre que ces enzymes sont synthétisés à la fin du processus métabolique au moment de la division.

Le blocage de la division des corps initiaux s'effectue encore à deux autres niveaux : lors de l'inhibition de la synthèse de l'ADN par le sulfafurazole, la réplication du génome et sa répartition dans les deux cellules-filles ne pouvant se réaliser, et lorsque la paroi est incomplètement formée, du fait de l'addition de pénicilline qui empêche les liaisons interpeptidiques.

Aussi il nous semble que chez les Chlamydiae le mode de division est identique à celui qui est observé chez les autres bacilles Gram négatif.

De nombreuses *figures lysosomales* ont été trouvées avec une fréquence relativement importante en présence de rifamycine SV et de chloramphénicol. Depuis que FRIIS (44) a montré que des corps élémentaires infectieux inactivés par la chaleur ou par un antisérum étaient phagocytés par la cellule puis détruites par les phosphatases lysosomales de la cellule-hôte il est tentant de penser qu'un mécanisme analogue s'est produit : les corps élémentaires infectieux provenant de l'inoculum ont été phagocytés par la cellule puis bon nombre sont restés en latence ; pendant ce temps l'addition des antibiotiques a eu lieu et ceux-ci ont alors bloqué tout métabolisme, inactivant les particules chlamydiales et facilitant leur digestion par les phosphatases lysosomales. La constatation que seuls ces deux antibiotiques provoquent une diminution importante de l'infection cellulaire vient appuyer cette hypothèse : la diminution du nombre des inclusions serait donc due à la destruction des particules infectieuses inactivées par les antibiotiques.

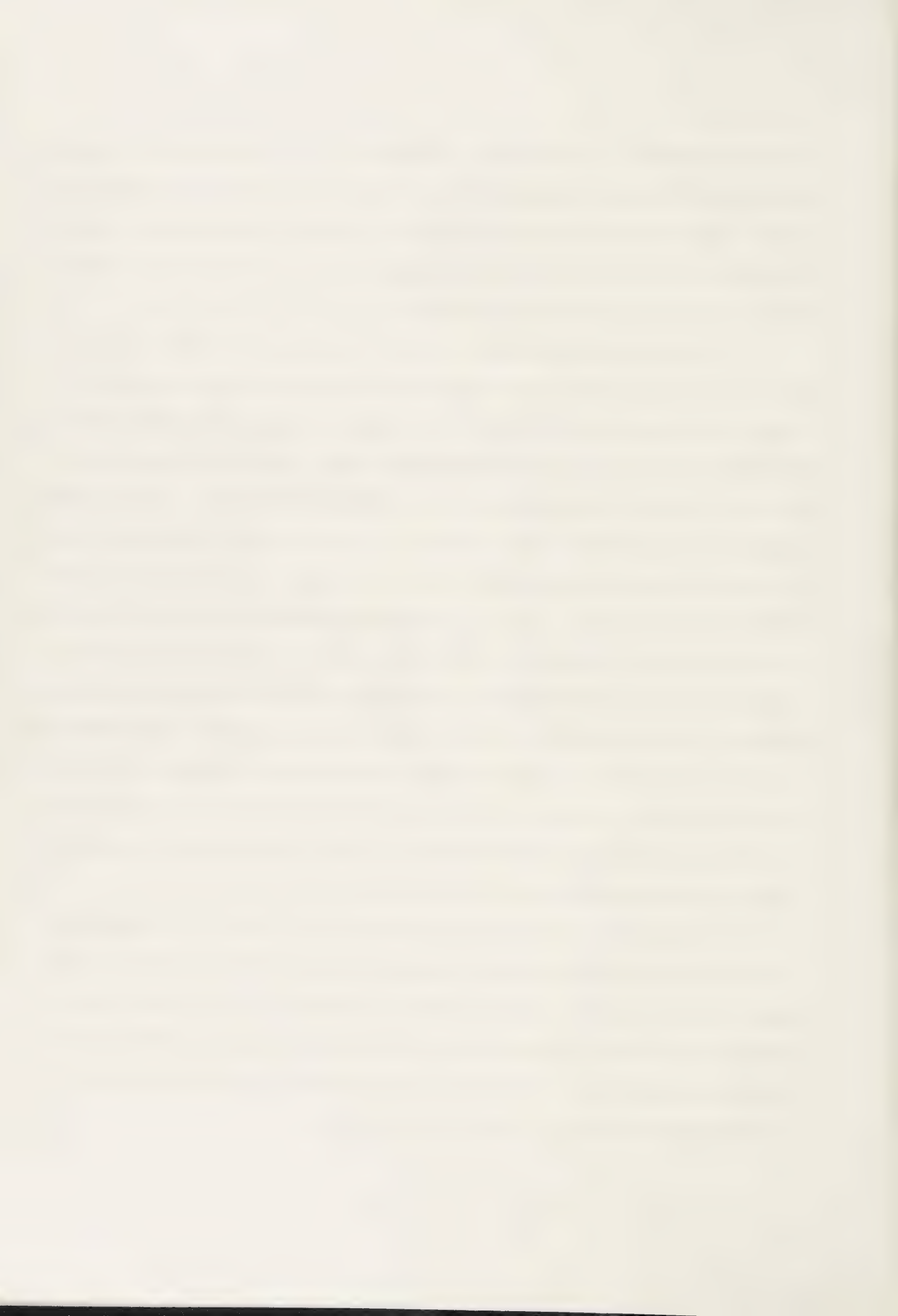
Ces modifications ont été trouvées avec quatre des six substances que



nous avons étudiées (sulfafurazole - rifamycine SV - chloramphénicol - pénicilline) et elles étaient accompagnées d'une diminution du nombre des cellules parasitées. Mais les deux autres (gentamicine et colistine) n'entraînaient aucune diminution du nombre des cellules parasitées ni même de modifications valables excepté pour la gentamicine à fortes doses.

Il est alors bien difficile de savoir si ces antibiotiques sont réellement inactifs ou si leur point d'impact existe mais ne peut-être atteint à cause d'une absence de pénétration à l'intérieur de la cellule bactérienne. Ce problème nous paraissant très important nous avons essayé de l'approfondir mais nos recherches bibliographiques sont restées infructueuses. Peu de travaux récents ont été effectués dans ce domaine ; le plus souvent l'étude de l'action d'un antibiotique sur une bactérie se fait directement par contact de cet antibiotique sur la bactérie. Mais ici la relation bactérie-antibiotique n'est plus suffisante et fait intervenir la cellule-hôte dont les différentes barrières de perméation doivent être franchies. Les quelques modifications que nous avons pu observer avec la gentamicine à fortes doses résultent peut-être d'une pénétration forcée de cet antibiotique due aux fortes concentrations réalisées dans le milieu extra-cellulaire. Il serait d'ailleurs très intéressant dans le cas présent de connaître la concentration antibiotique du milieu extra-cellulaire et celle du milieu intra-cellulaire afin de les comparer.

Ces remarques sur la pénétration des antibiotiques à l'intérieur des cellules ne sont pas exclusives au trachome mais sont valables pour tous les germes pouvant comporter une phase intra-cellulaire, tels les Rickettsies, les *Listeria* ou les *Brucelles*, des échecs thérapeutiques pouvant en effet être expliqués précisément par l'impossibilité de certains antibiotiques à réaliser une concentration suffisante au niveau de ces repaires.



P L A N C H E S

◦ ◦
◦



T E M O I N

PLANCHE 1

Microscopie optique

Fig. 1 - Inclusions à la 48^{ème} heure du cycle.
X 3500

Microscopie électronique

Fig. 2 - Corps élémentaire (Ce)
X 51750

Fig. 3 - Corps initial (Ci)
X 51000

Fig. 4 - Corps intermédiaires (Cm)
X 51750

Fig. 5 - Fission binaire d'un corps initial.
X 51000

Fig. 6 - Présence simultanée des 3 types de particules dans une inclusion arrivée à maturité : 72^{ème} heure du cycle.
X 28750

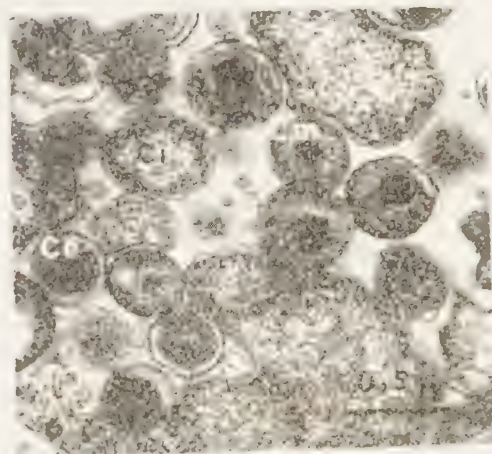
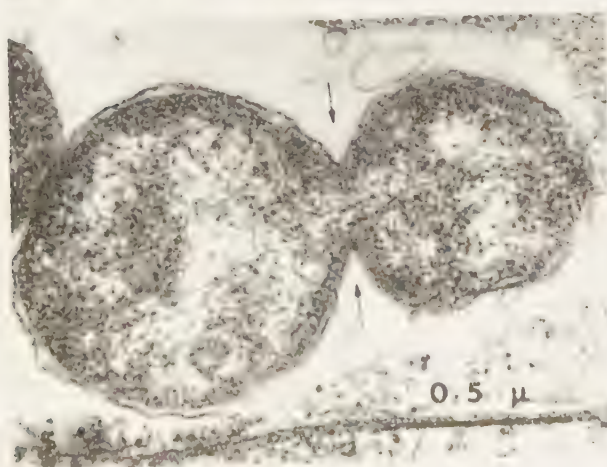
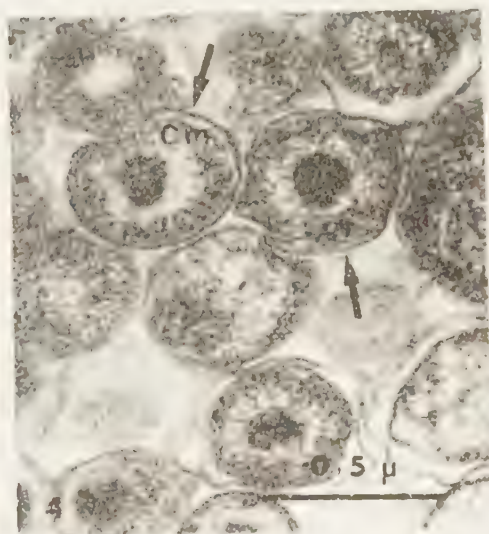
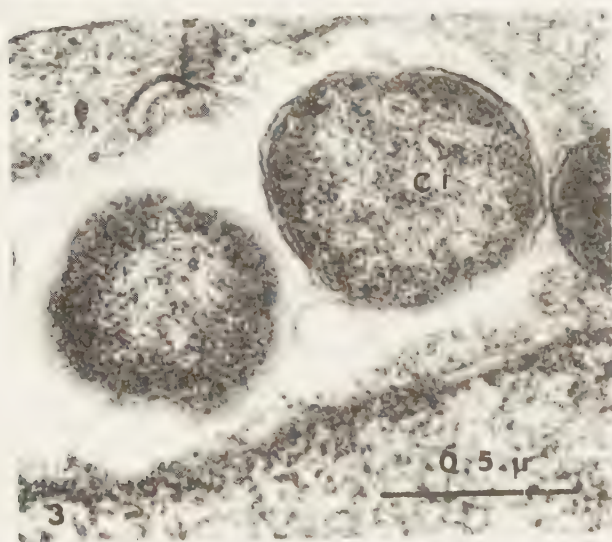
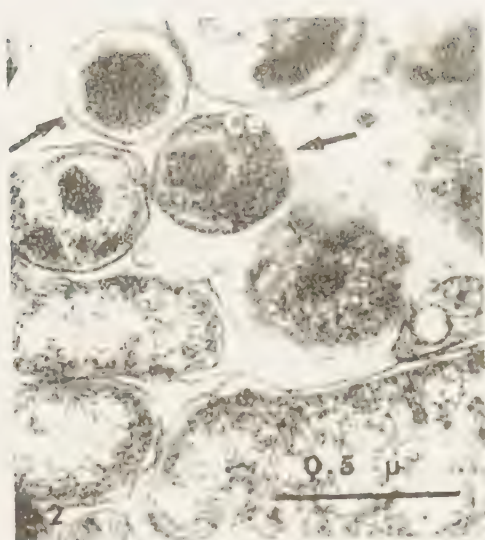
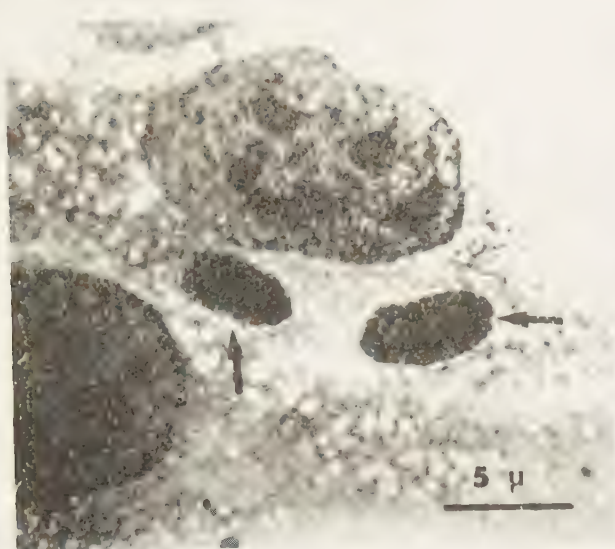


PLANCHE 2

Inclusion arrivée à maturité ; 72 éme heure du cycle. La plupart des corps élémentaires présentent une vacuole grisâtre creusée dans leur cytoplasme. Des corps initiaux géants (Cg) se mêlent parfois aux autres particules.

X 21000

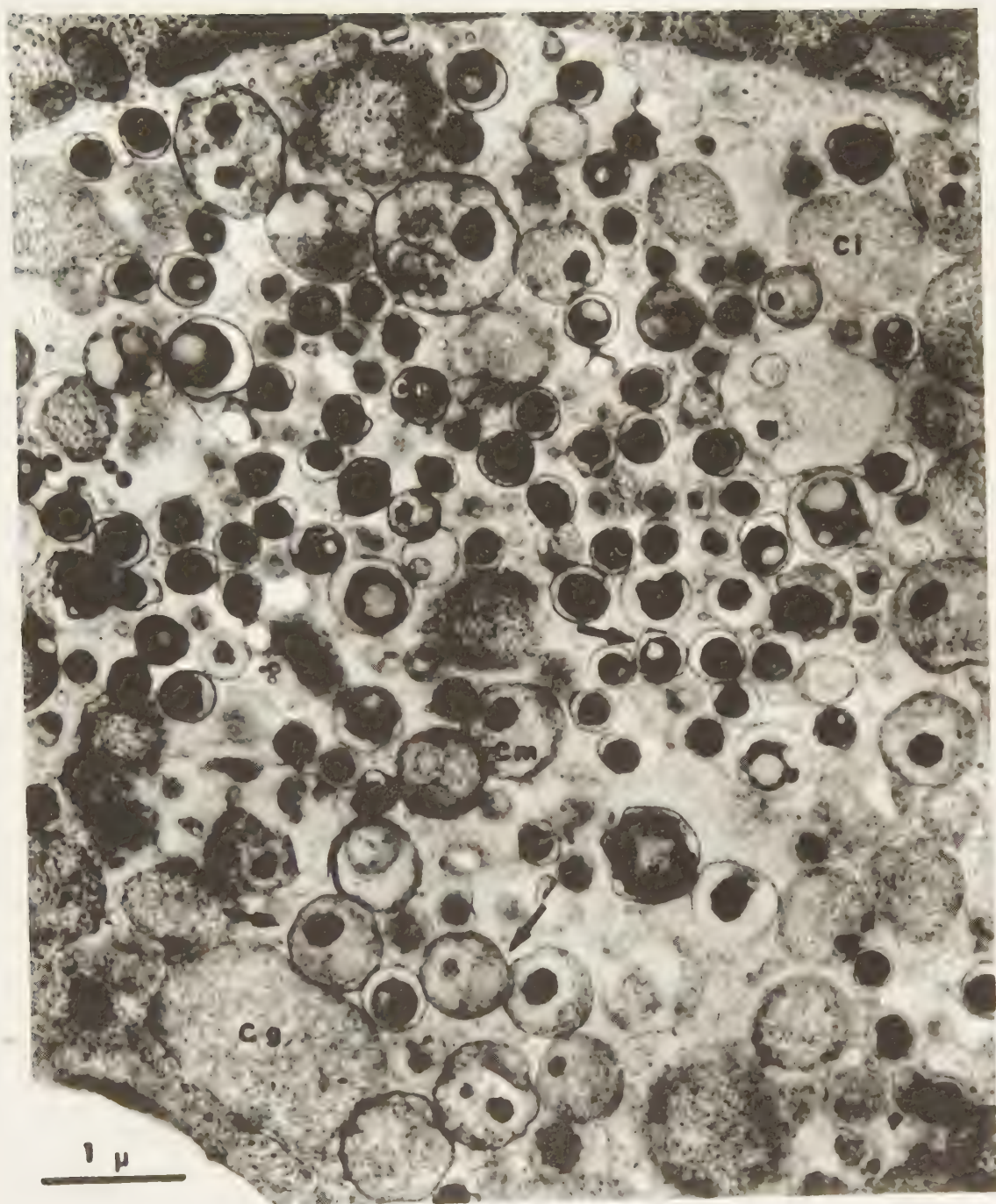


PLANCHE 3

*Justaposition de plusieurs inclusions à la 72^{ème} heure du cycle.
Des étranglements cytoplasmiques sont encore visibles mais la fusion des
inclusions est amorcée.*

*Sur la partie supérieure du cliché le pont cytoplasmique est
constitué d'une mitochondrie étirée (M) qui vient de se rompre.*

*Certains corps élémentaires possèdent à l'intérieur de leur
vacuole des structures dont les formes rappellent celles de cristaux ou de
rosettes.*

X 26400

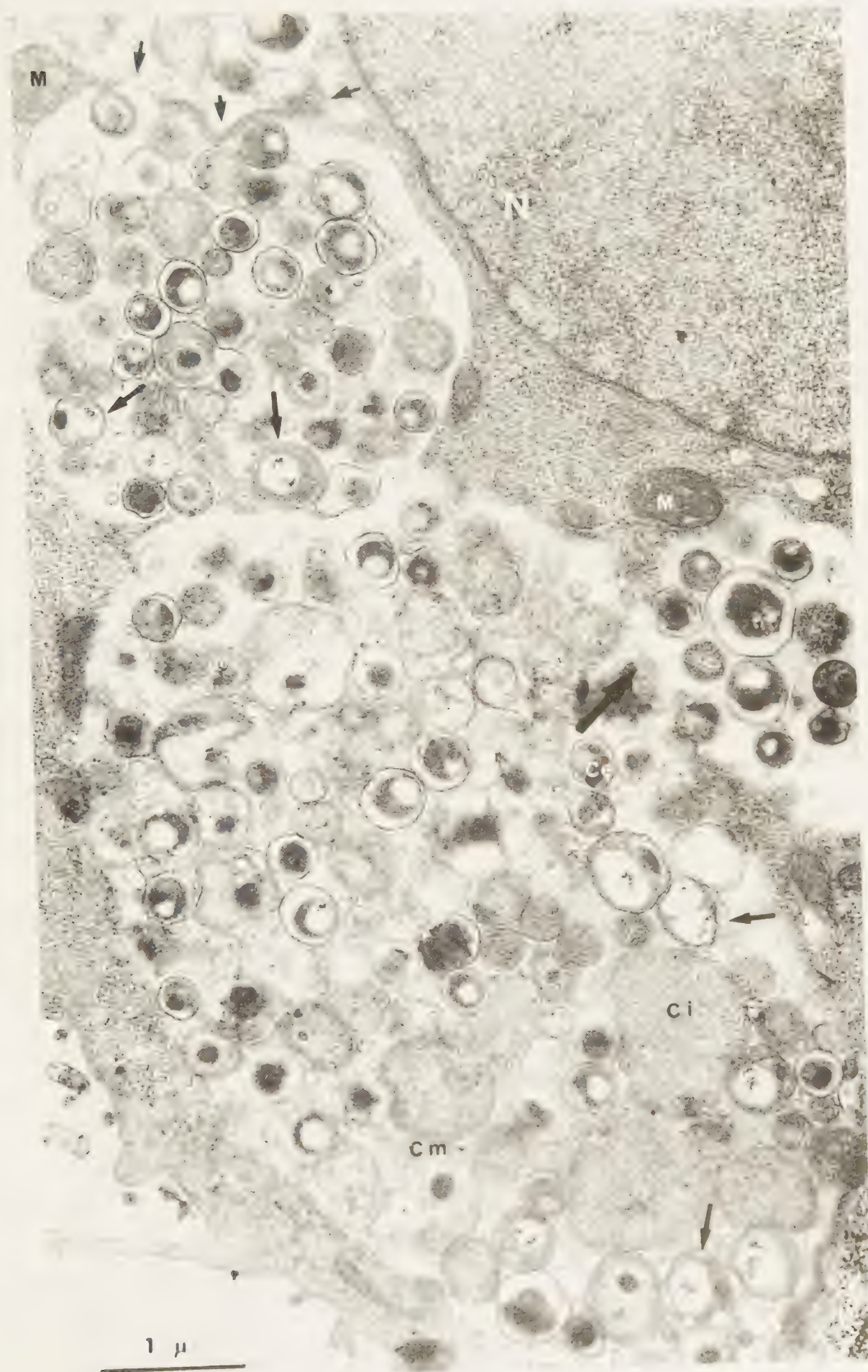


PLANCHE 4

Fig. 1 - Inclusion renfermant des corps élémentaires creusés de vacuoles claires, transparentes aux électrons.

X 28750

*Fig. 2 - Le cytoplasme de certains corps initiaux présente des petits "bâtonnets" vraisemblablement constitués d'ADN.
Noter la présence de figures myéliniques à l'intérieur de l'inclusion.*

X 51600

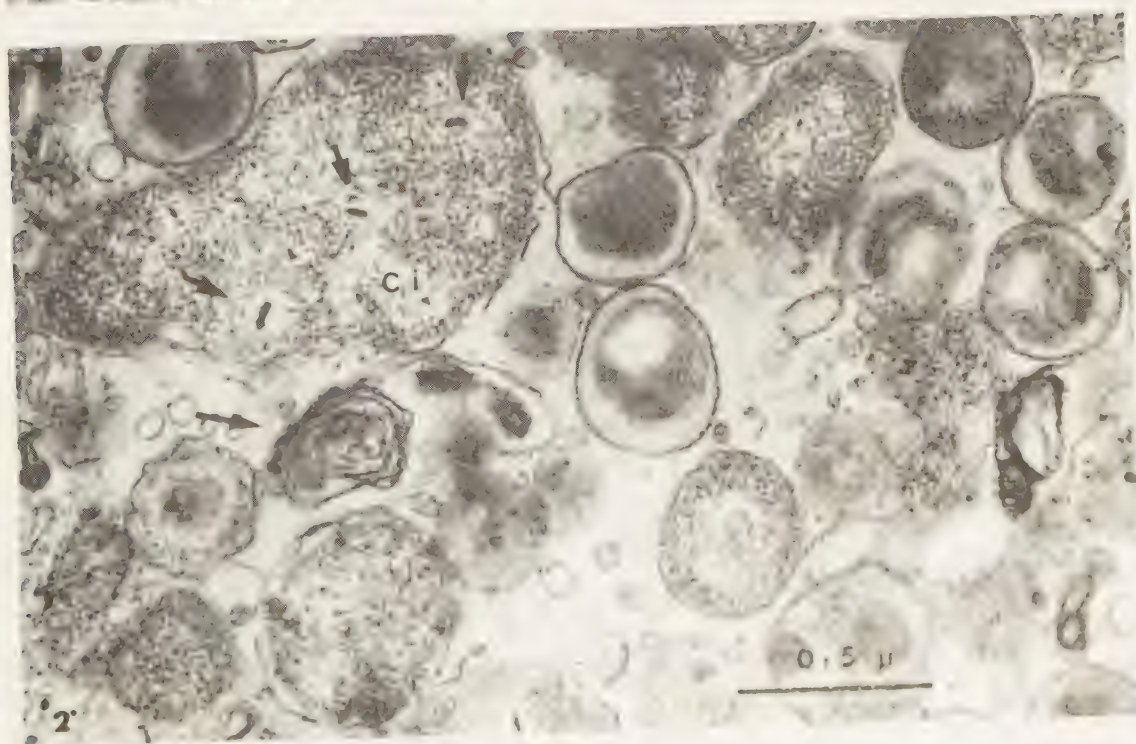
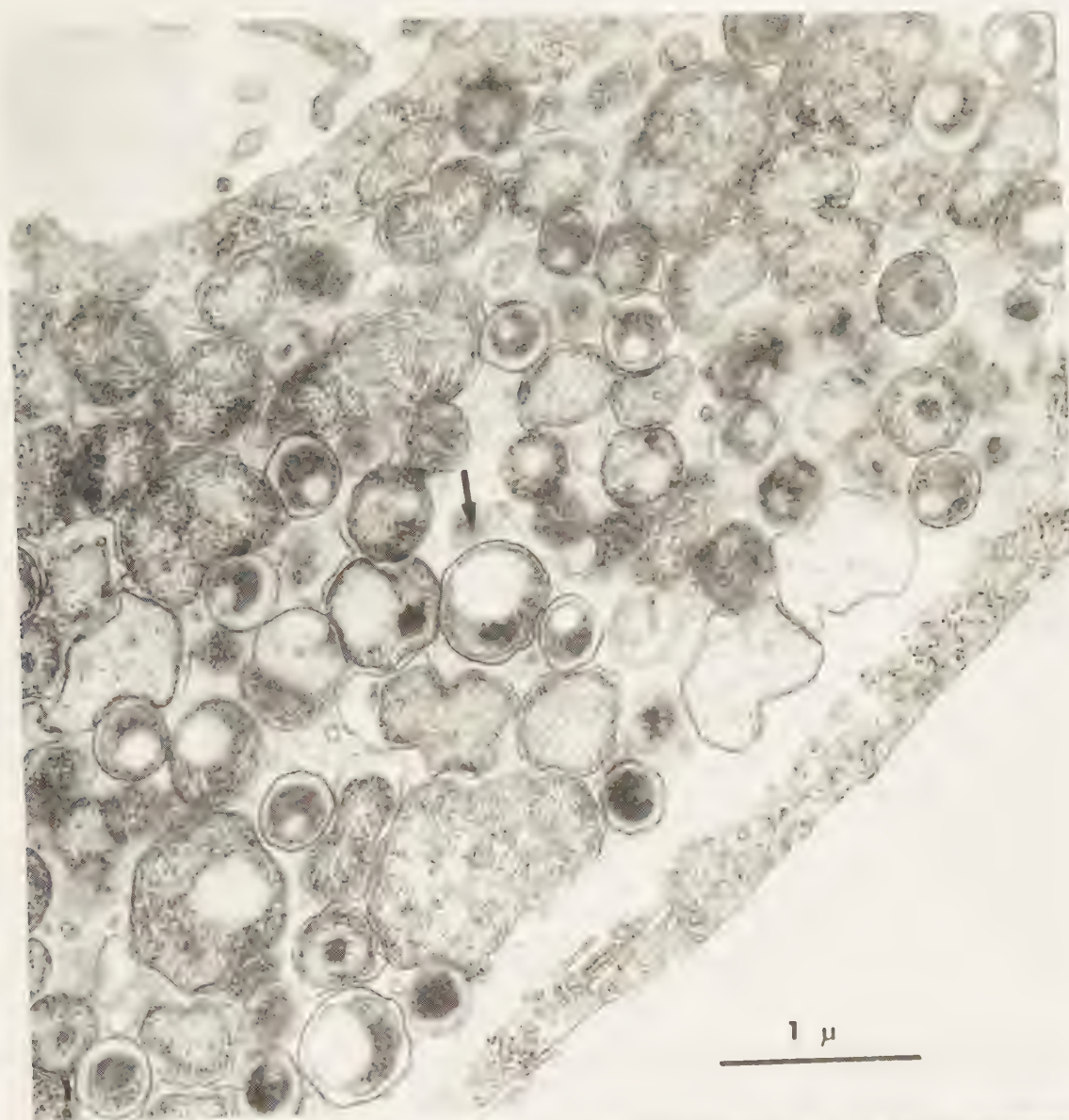


PLANCHE 5

Fig. 1 - Nombreuses mitochondries bordant une inclusion ; certaines s'accolent étroitement à la vacuole.

X 43000

Fig. 2 - Corps initial en fission binaire ; une des cellules-filles présente simultanément des bourgeonnements.

X 43000

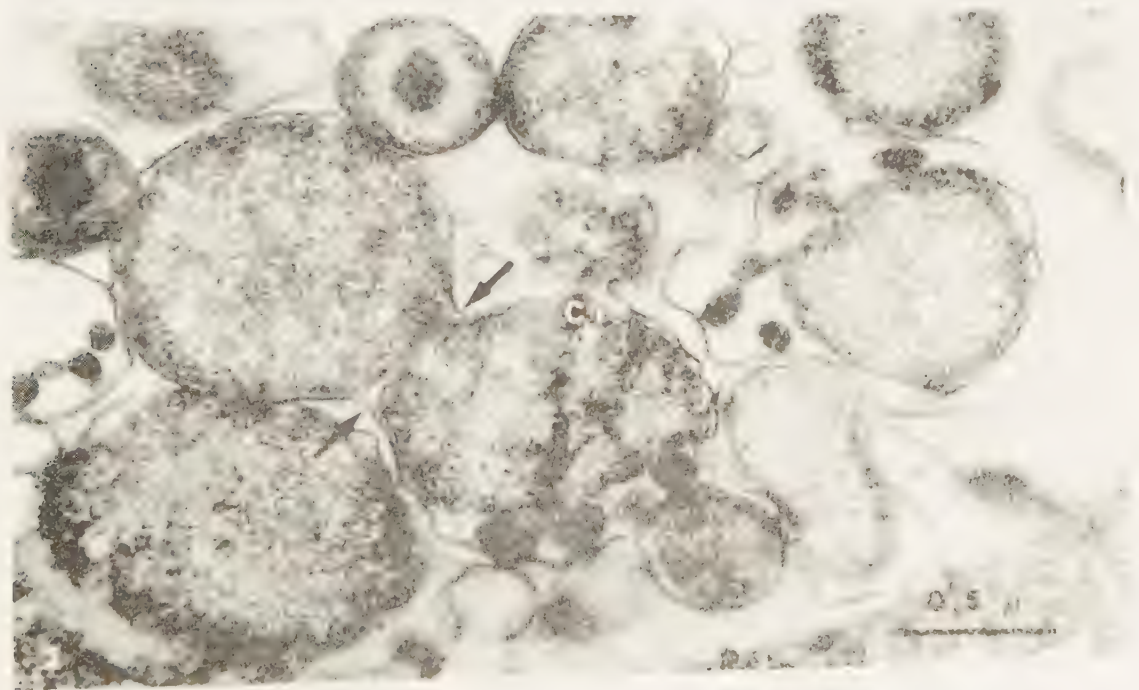
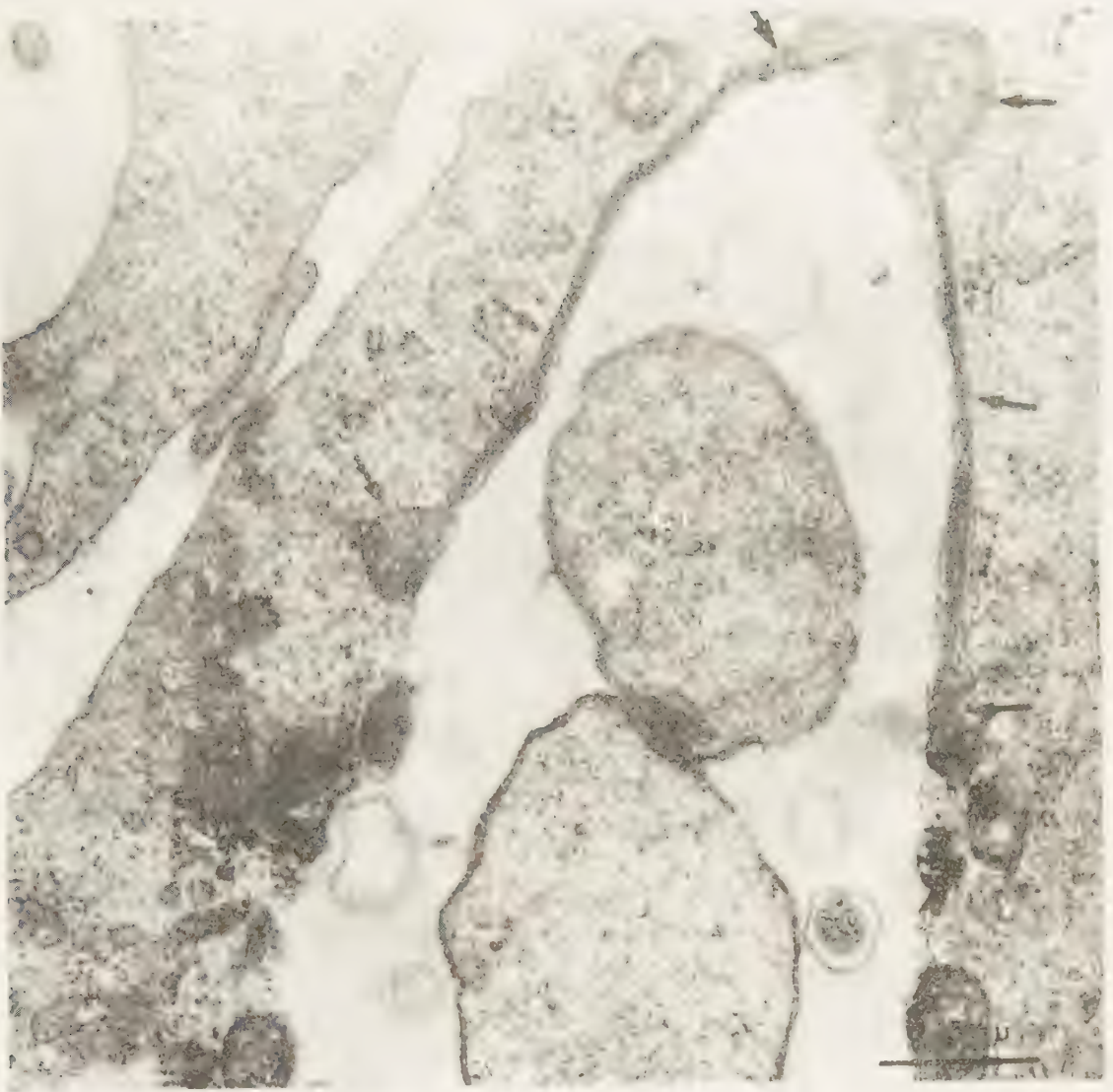


PLANCHE 6

Fig. 1 - La paroi des corps initiaux ondule et émet des pseudopodes.

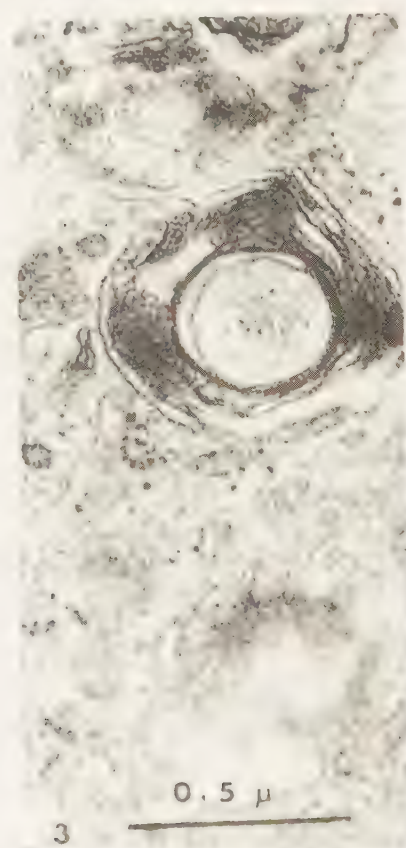
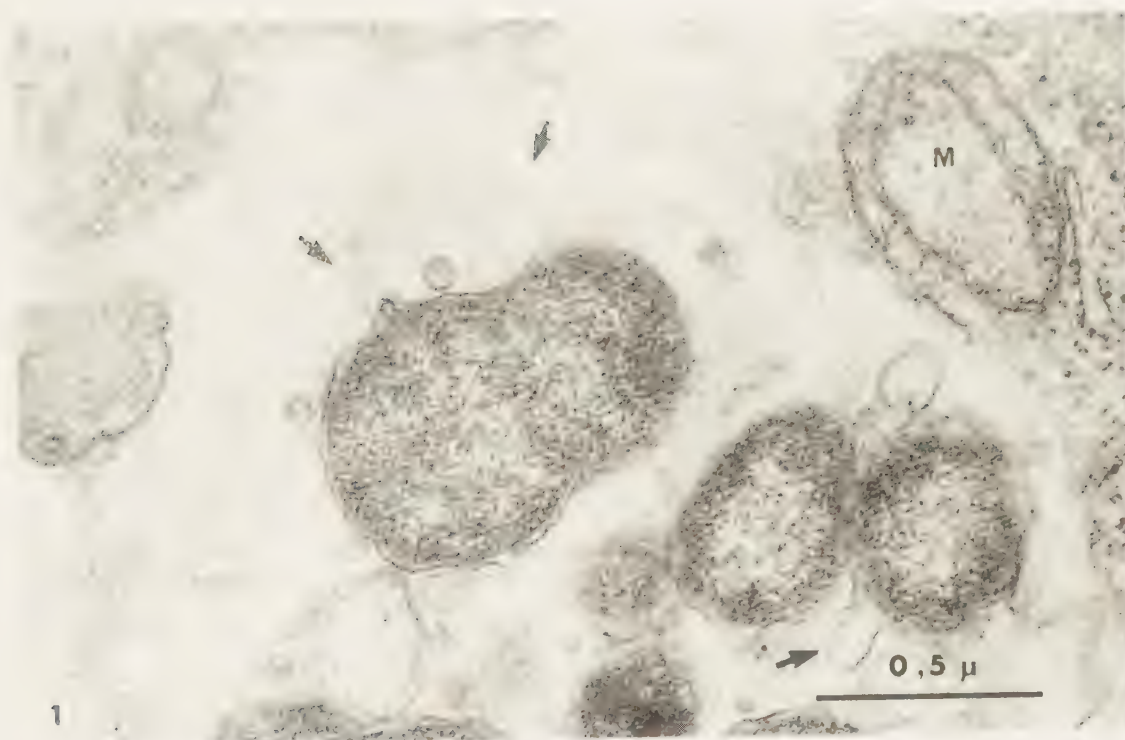
X 60200

Fig. 2 - Petite inclusion contenant des particules anormales : corps initial dont la masse cytoplasmique a éclaté en bourgeons, corps élémentaire de grande taille. Noter la présence de réticulum endoplasmique (R.E) sous forme de lamelles annelées à proximité de l'inclusion.

X 34500

Fig. 3 - Figure myélinique observée dans le cytoplasme de la cellule hôte : cette image évoque celle d'un lysosome secondaire digérant une particule chlamydiale.

X 60200





S U L F A F U R A Z O L E

PLANCHE 7

SULFAPURAZOLE 0,5 ug/ml

La plupart des inclusions cultivées en présence de cette dose de sulfapurazole sont identiques à celles des témoins. Les trois types de particules (Ce - Ci - Cm) sont présents, mêlés à de rares corps géants (Cg).

X 25200

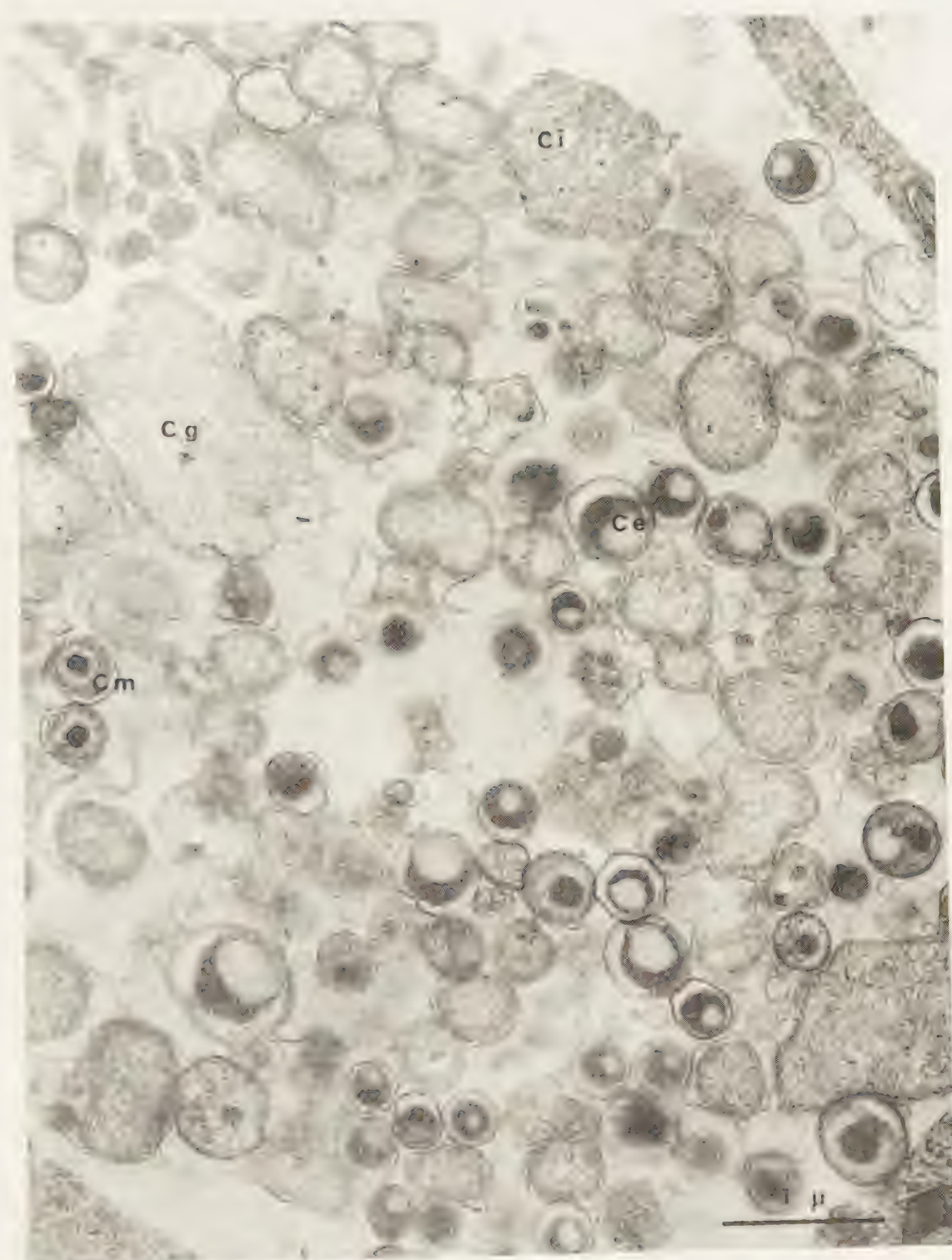


PLANCHE 8

SULFAFURAZOLE 0,5 µg/ml

Fig. 1 - Présence à l'intérieur d'une inclusion d'une figure myélinique à feuilletts très épais.

X 34500

Fig. 2 - Une substance granuleuse est nettement visible dans les vacuoles des corps élémentaires. Deux de ces vacuoles sont présentes dans un corps intermédiaire dont la fission semble anormale.

X 25200

Fig. 3 - La paroi de certains corps initiaux est lâche et largement décollée du cytoplasme qui bourgeonne parfois.

X 28750

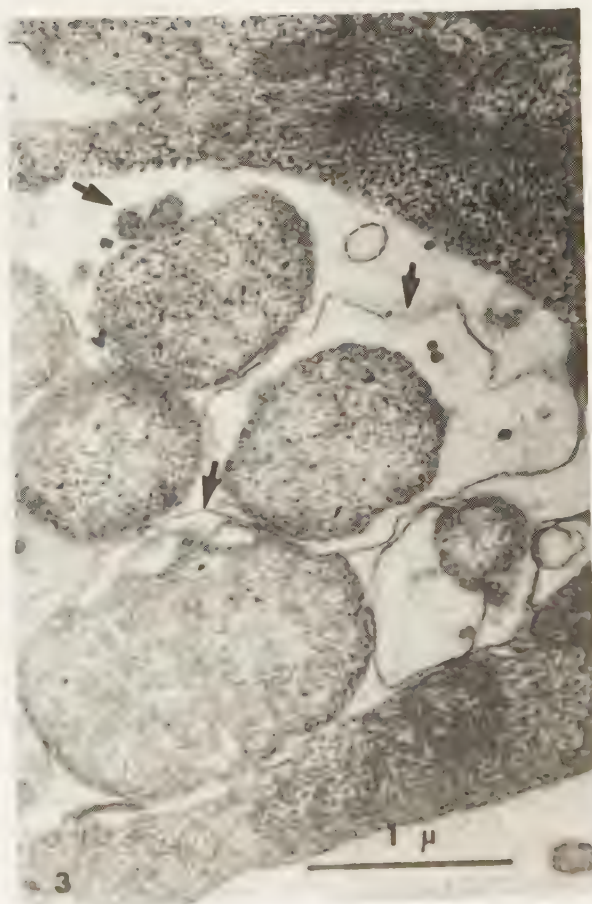
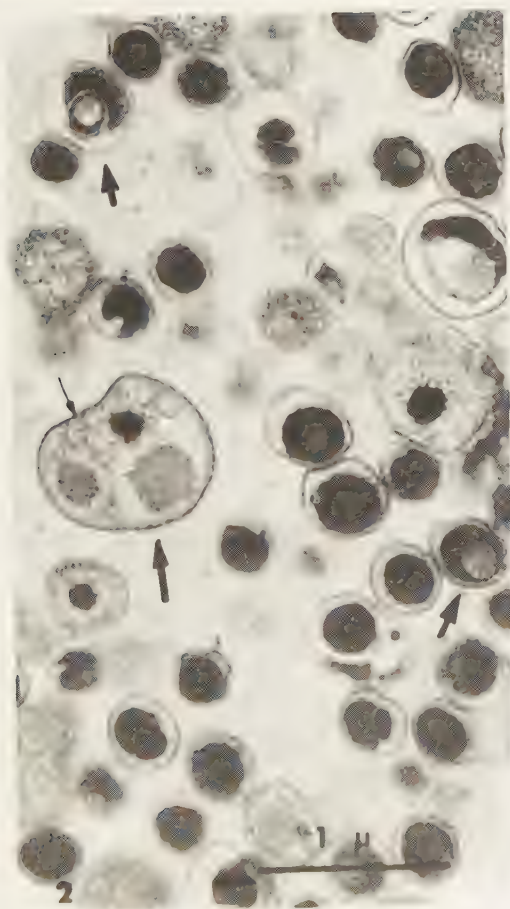
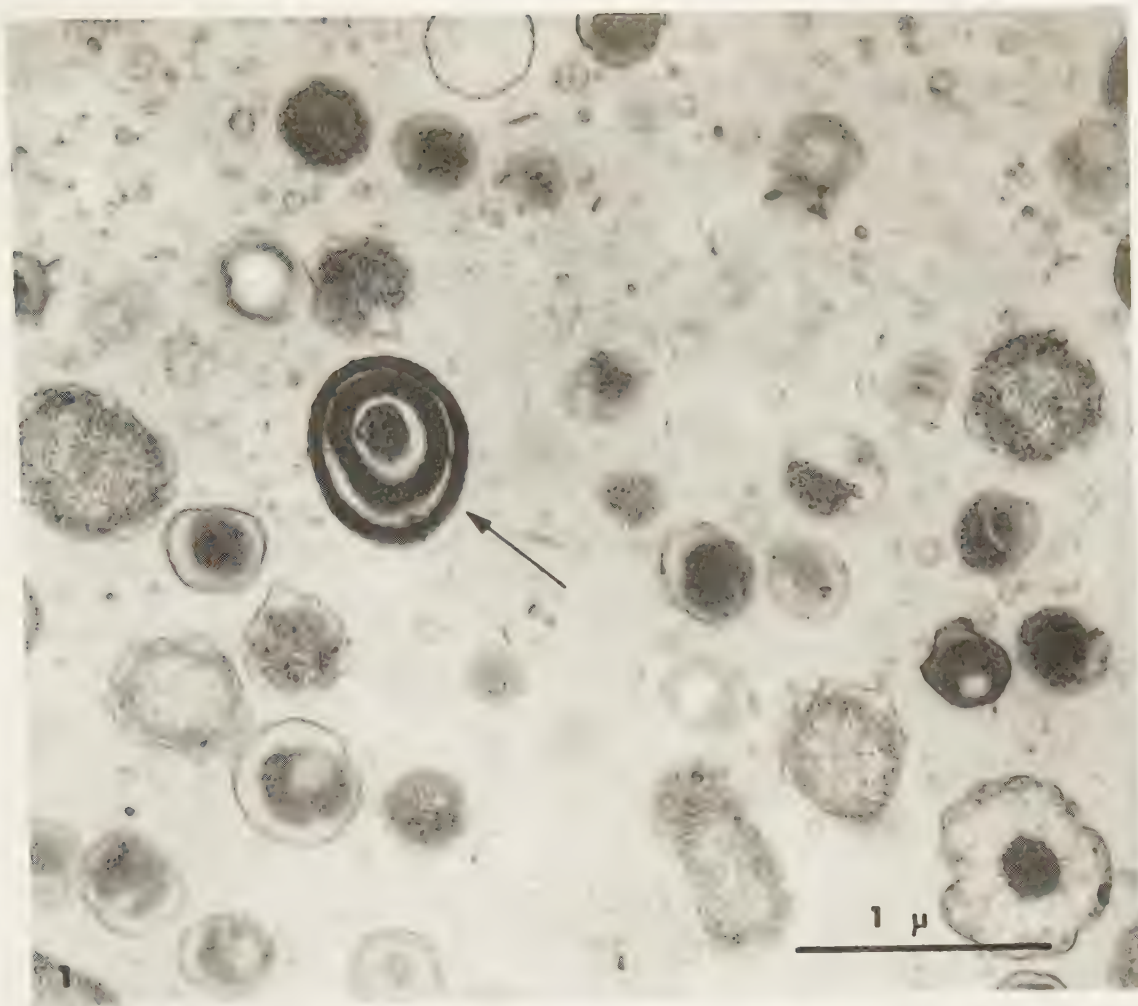


PLANCHE 9

SULFAFURAZOLE 50 $\mu\text{g/ml}$

Important bourgeonnement du cytoplasme des corps initiaux qui est tourmenté et vacuolisé.

Sur la partie droite du cliché les deux inclusions sont séparées par une fine languette cytoplasmique uniquement occupée par une mitochondrie étirée.

X 23100

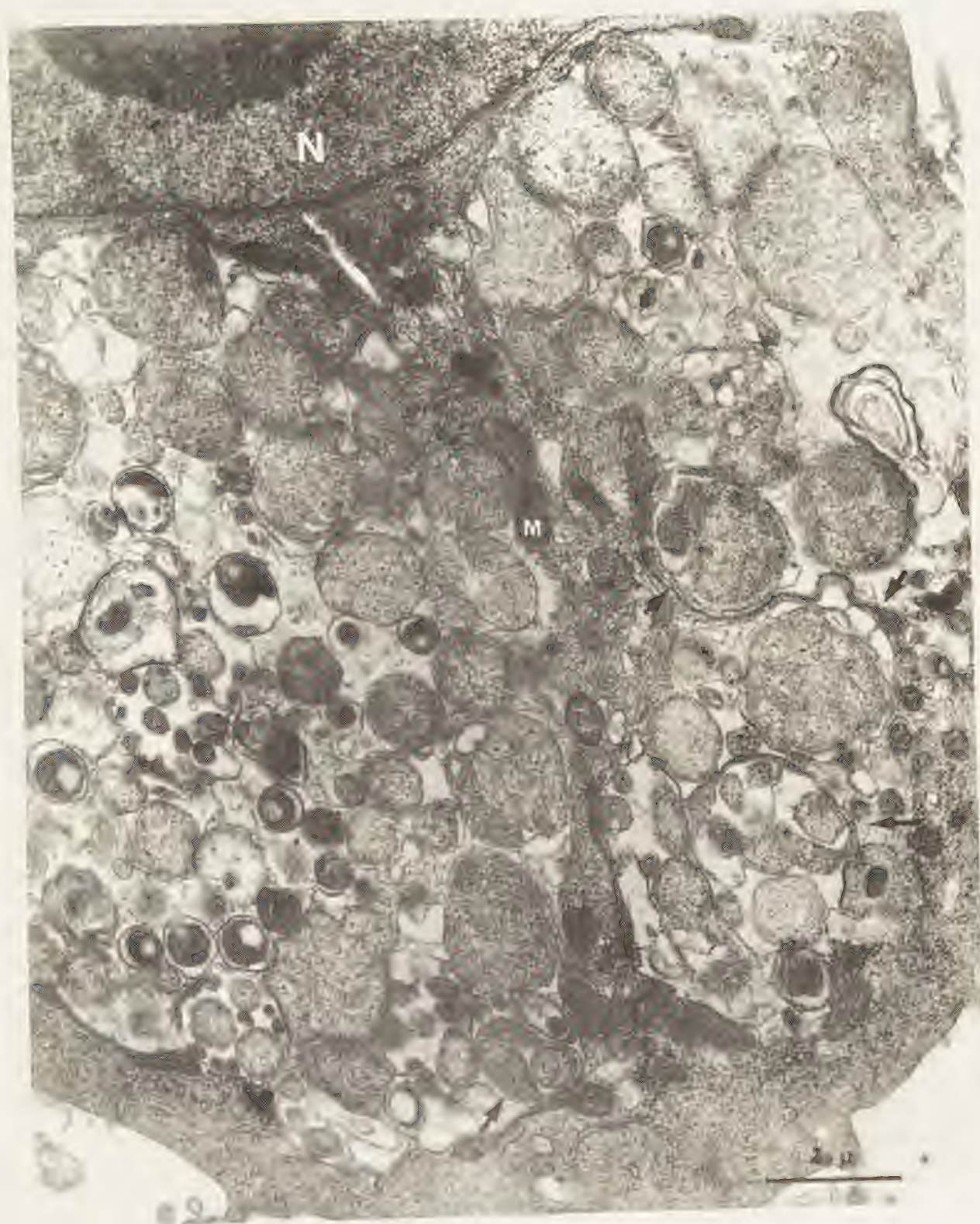


PLANCHE 10

SULFAFURAZOLE 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Corps initial anormal ; le cytoplasme est tourmenté et creusé d'une vacuole.

X 43000

Fig. 2 - Corps initial géant avec de nombreux bourgeons.

X 29400

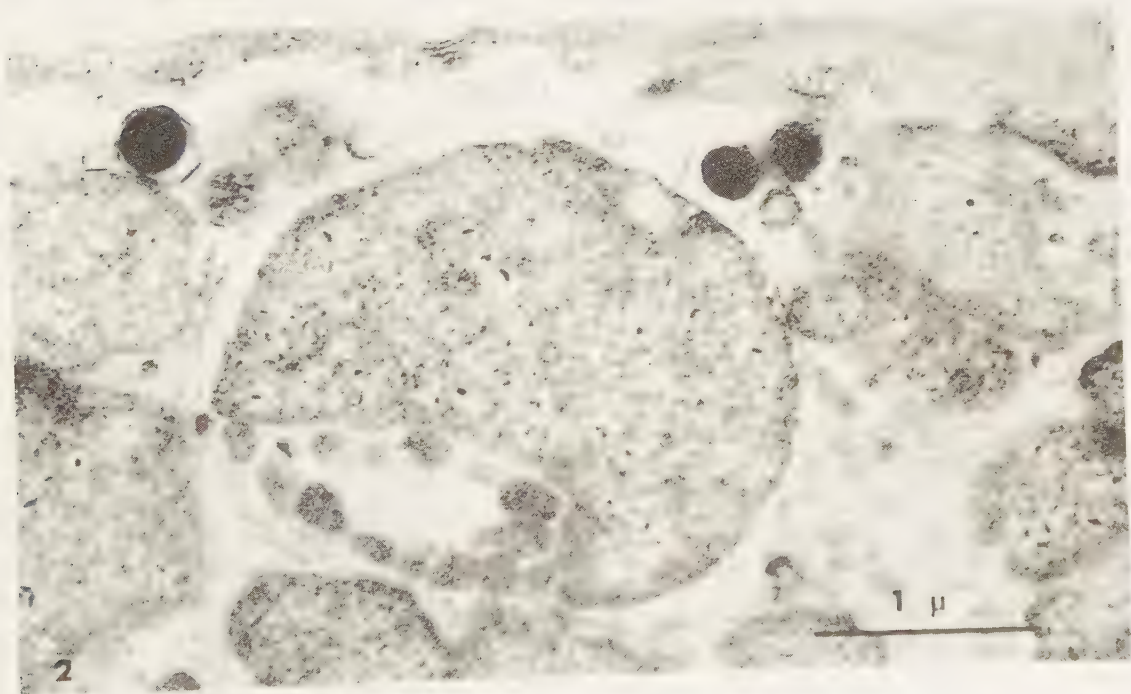
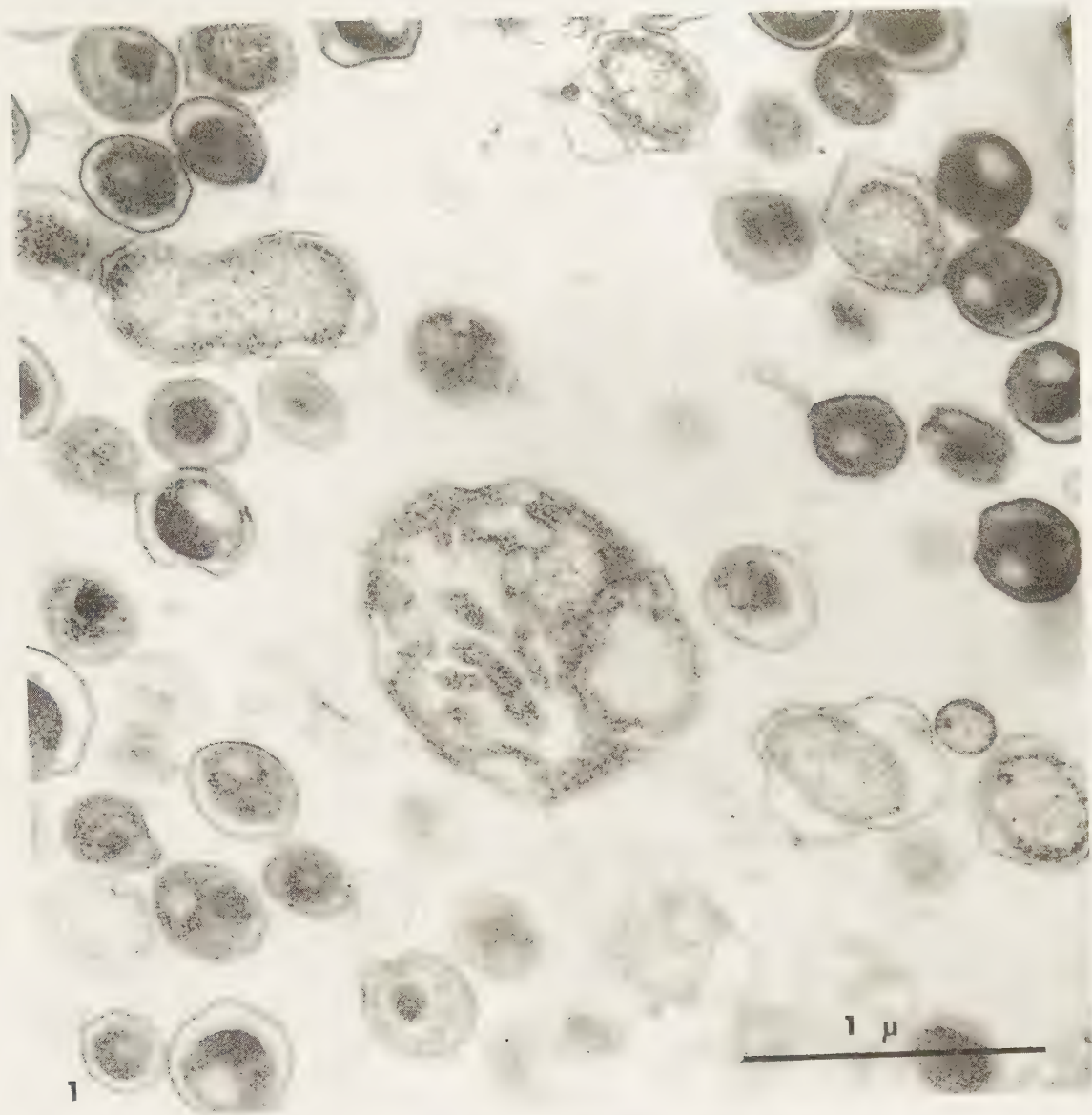


PLANCHE 11

SULFAPURAZOLE 500 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Microscopie électronique

La majorité des inclusions cultivées en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ de sulfapurazole ne contiennent que des corps initiaux. Ceux-ci ont souvent une taille supérieure à la normale (Corps géants = Cg) ; leur cytoplasme est déformé, accompagné de nombreux bourgeons. Quelquefois une vacuole se creuse à proximité de la membrane cytoplasmique réalisant une sorte d'"anse".

X 21000

Fig. 2 et 3 - Microscopie optique

X 3500

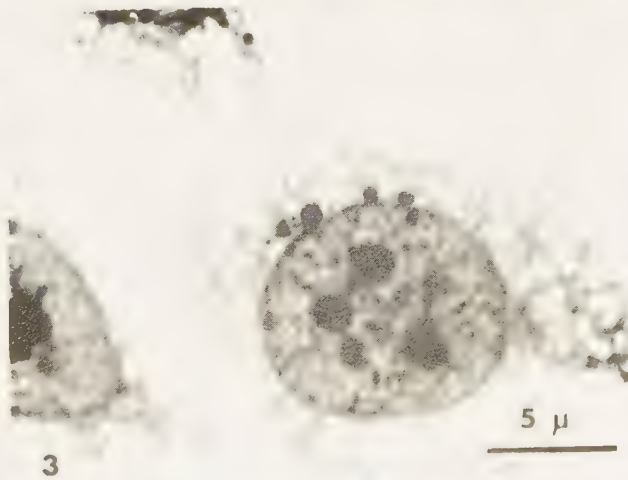
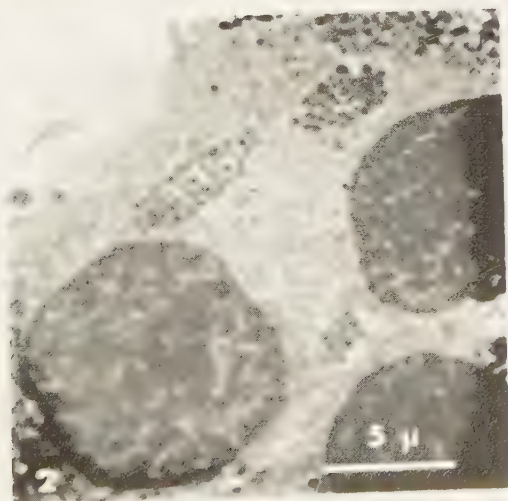
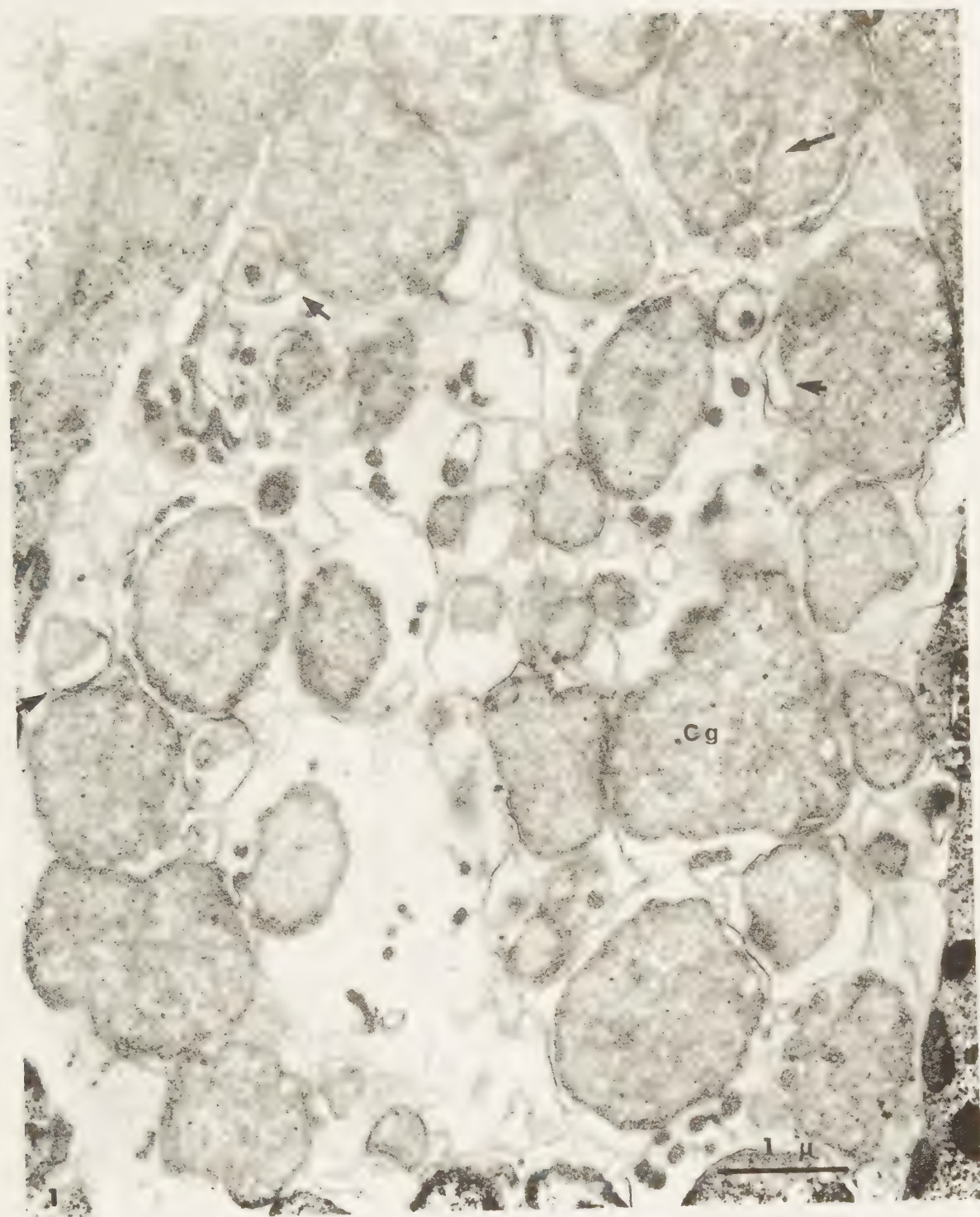


PLANCHE 12

SULFAFURAZOLE 500 $\mu\text{g/ml}$

Corps géants et accumulation de systèmes membranaires.

X 34500

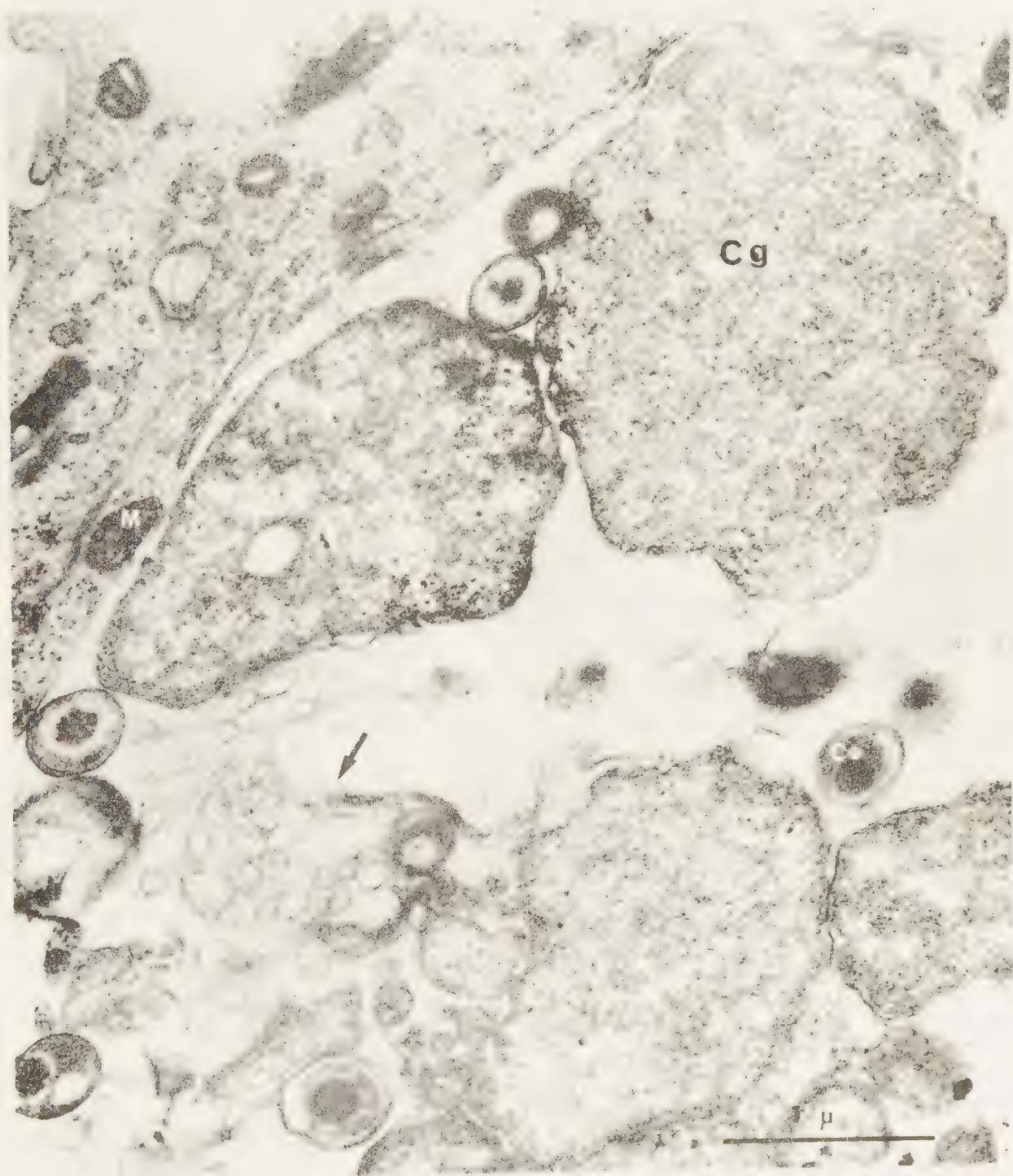


PLANCHE 13

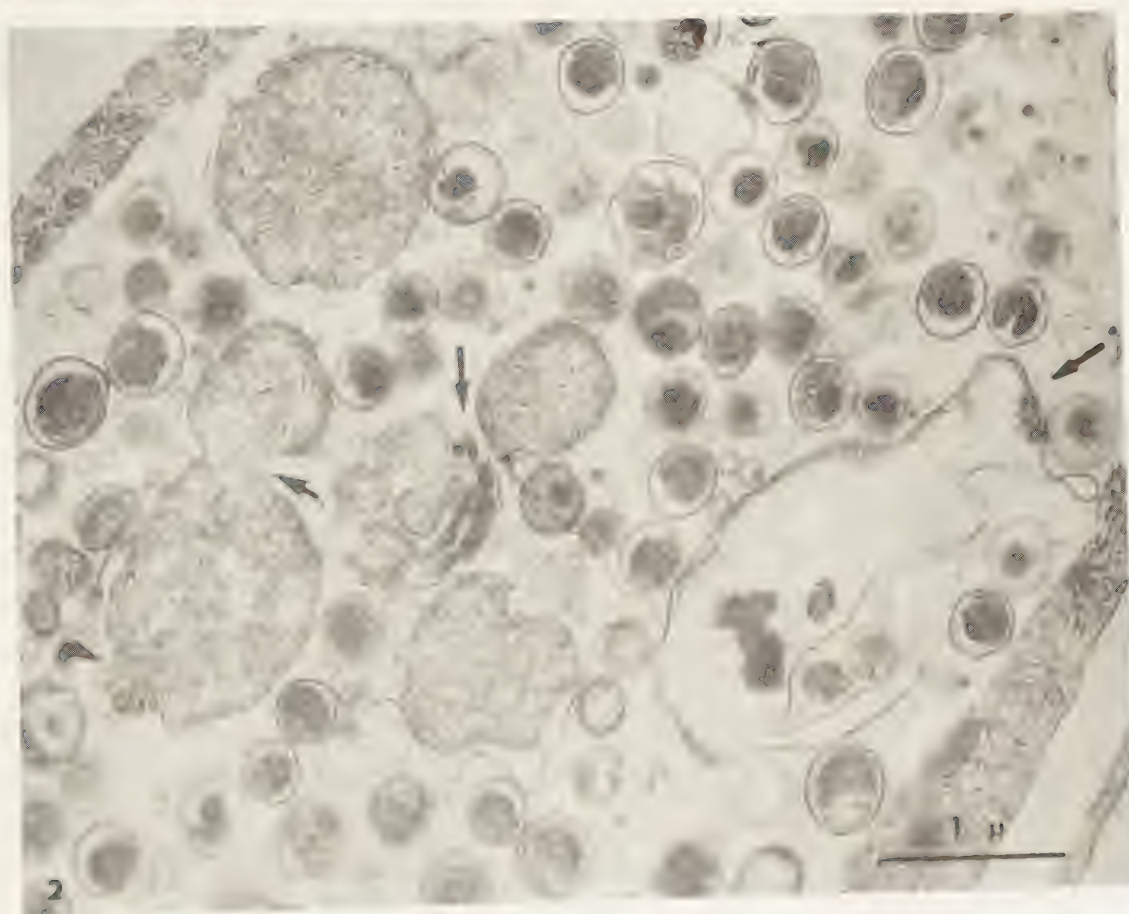
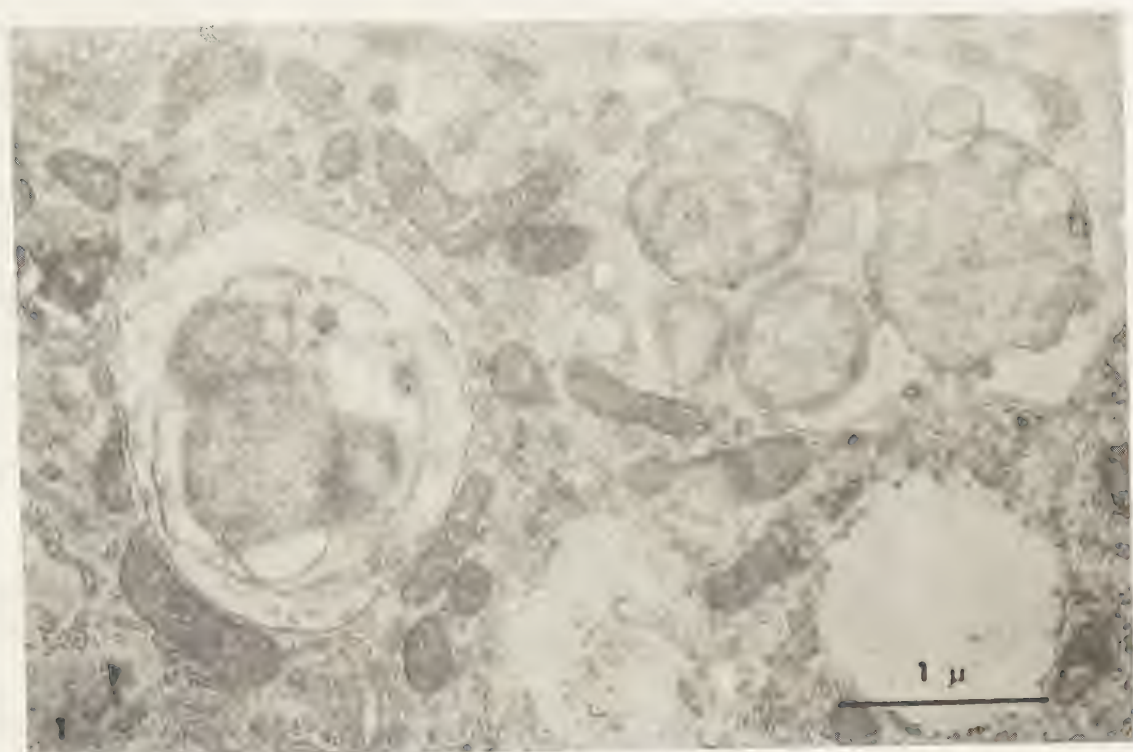
SULFAFURAZOLE 500 µg/ml

Fig. 1 - Petites inclusions. Celle qui est située sur la partie gauche du cliché contient un corps initial géant anormal.

X 28750

Fig. 2 - Quelques inclusions renferment une majorité de corps élémentaires normaux mêlés à des corps initiaux anormaux : corps déchiquetés, cytoplasme bourgeonnant ; l'un de ces corps se divise.

X 25200





R I F A M Y C I N E

PLANCHE 14

RIFAMYCINE SV 0,5 μ g/ml

Fig. 1 - Inclusion de taille moyenne contenant essentiellement des corps initiaux (Ci). L'un d'eux termine une fission binaire. Le cytoplasme de la cellule-hôte renferme souvent des figures lysosomales proches des inclusions.

X 28750

Fig. 2 - Fractions du noyau, isolées à proximité de la masse nucléaire principale. Il existe également des images lysosomales renfermant des éléments difficiles à identifier ; l'un d'eux évoque une particule chlamydiale

X 21000

Fig. 3 - Corps initial isolé.

X 43000

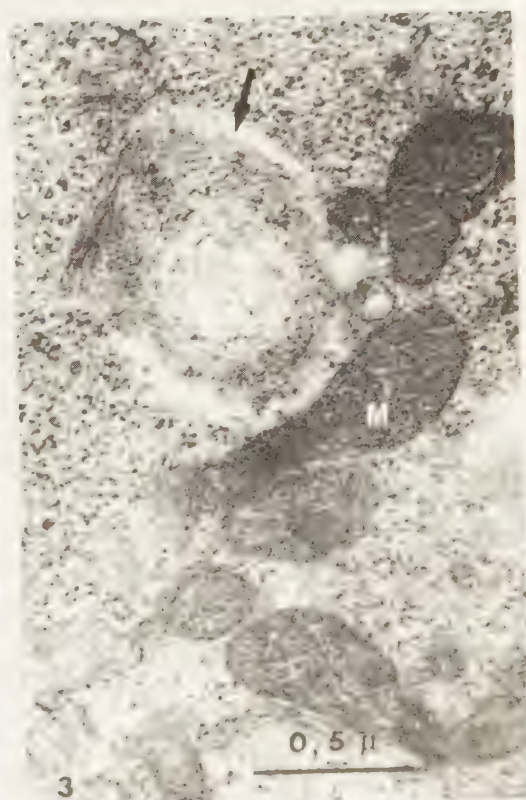
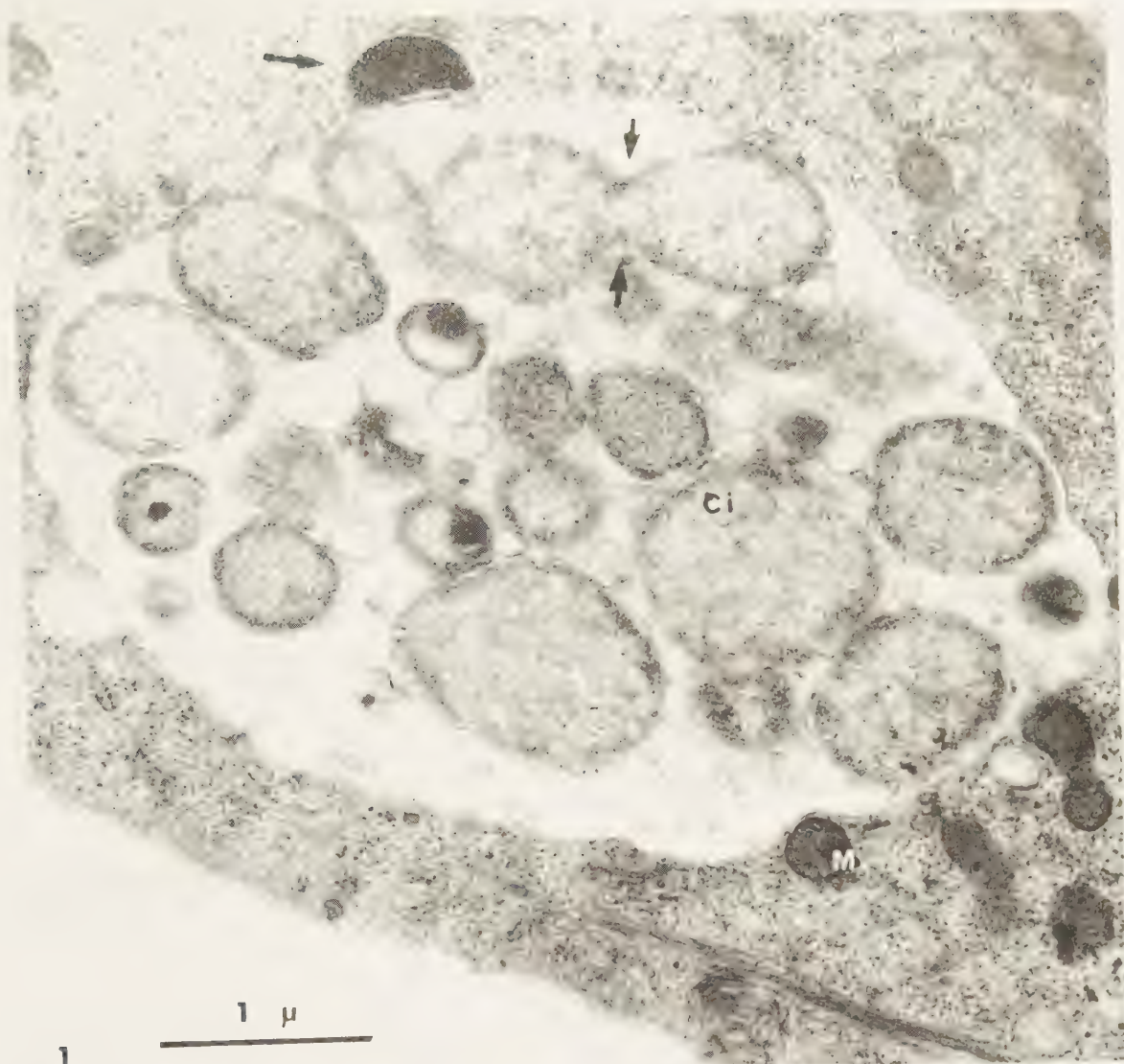


PLANCHE 15

RIFAMYCINE SV 0,5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Petite inclusion ne renfermant que des corps initiaux.

X 28750

Fig. 2 - Inclusion de grande taille à un stade plus avancé renfermant des corps élémentaires et des corps initiaux. Quelques unes des particules sont pauvres en ribosomes.

X 34500

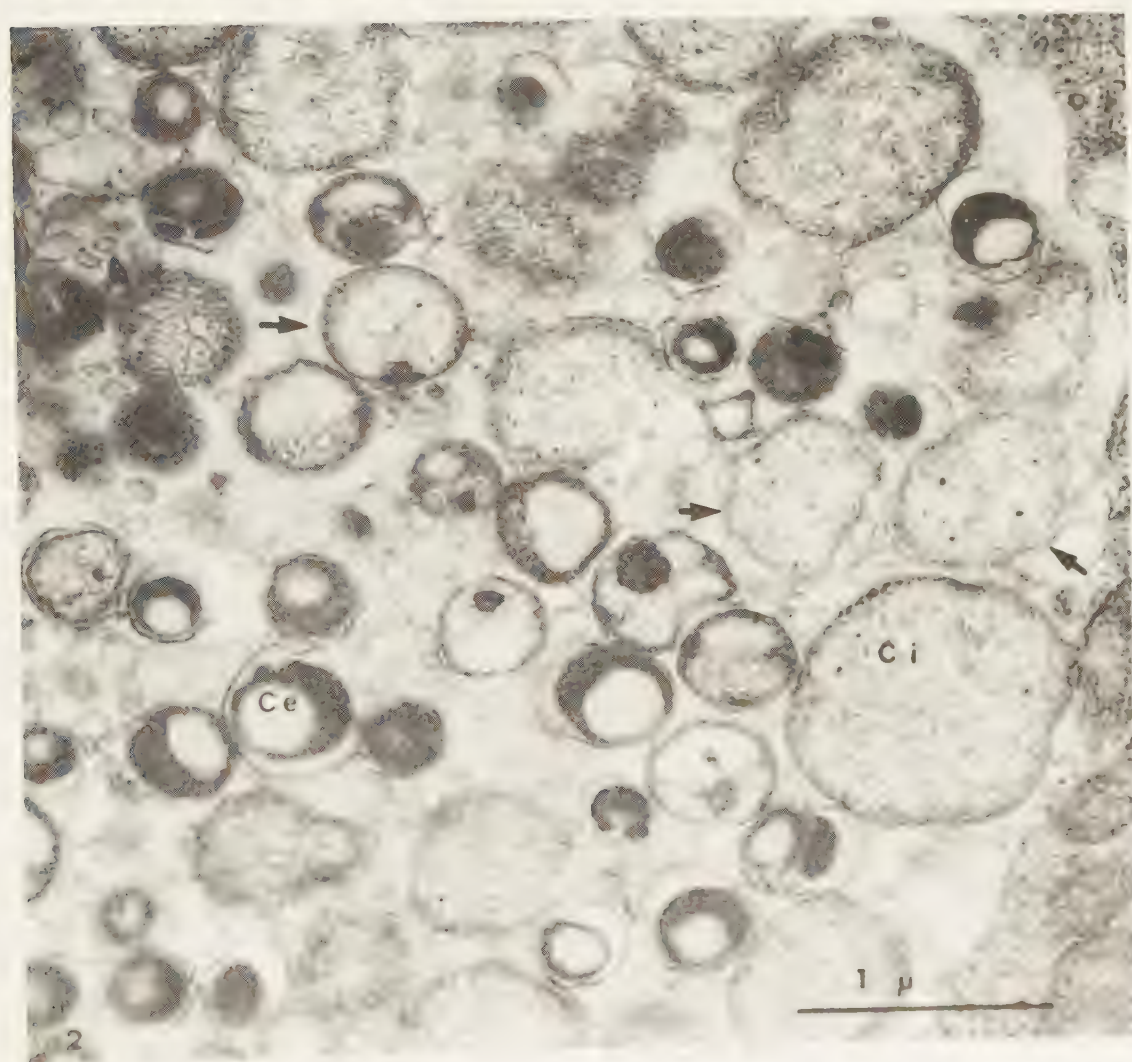
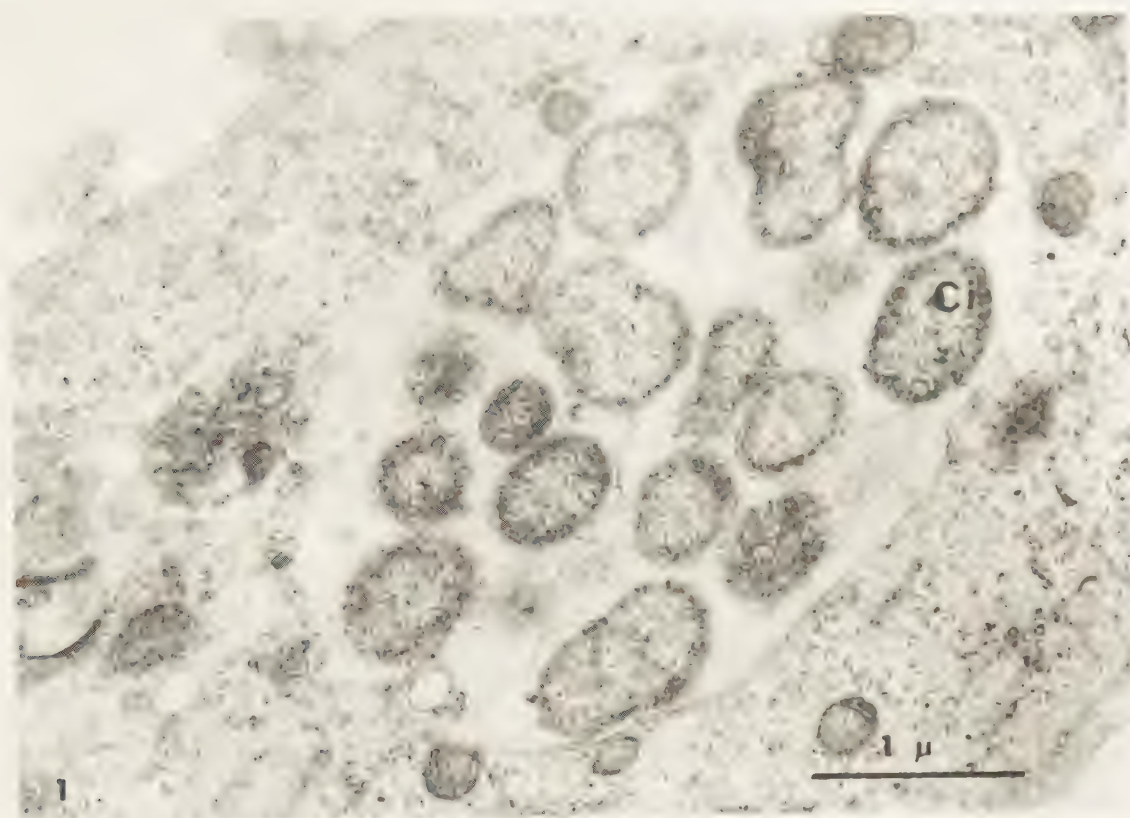


PLANCHE 16

RIFAMYCINE SV 0,5 μ g/ml

Fig. 1 - Nombreuses figures lysosomales dans le cytoplasme des cellules.

X 21000

Fig. 2 - Vacuole de phagocytose (PH) et lysosomes secondaires. Présence de lamelles annelées (RE) à proximité du noyau.

X 28750

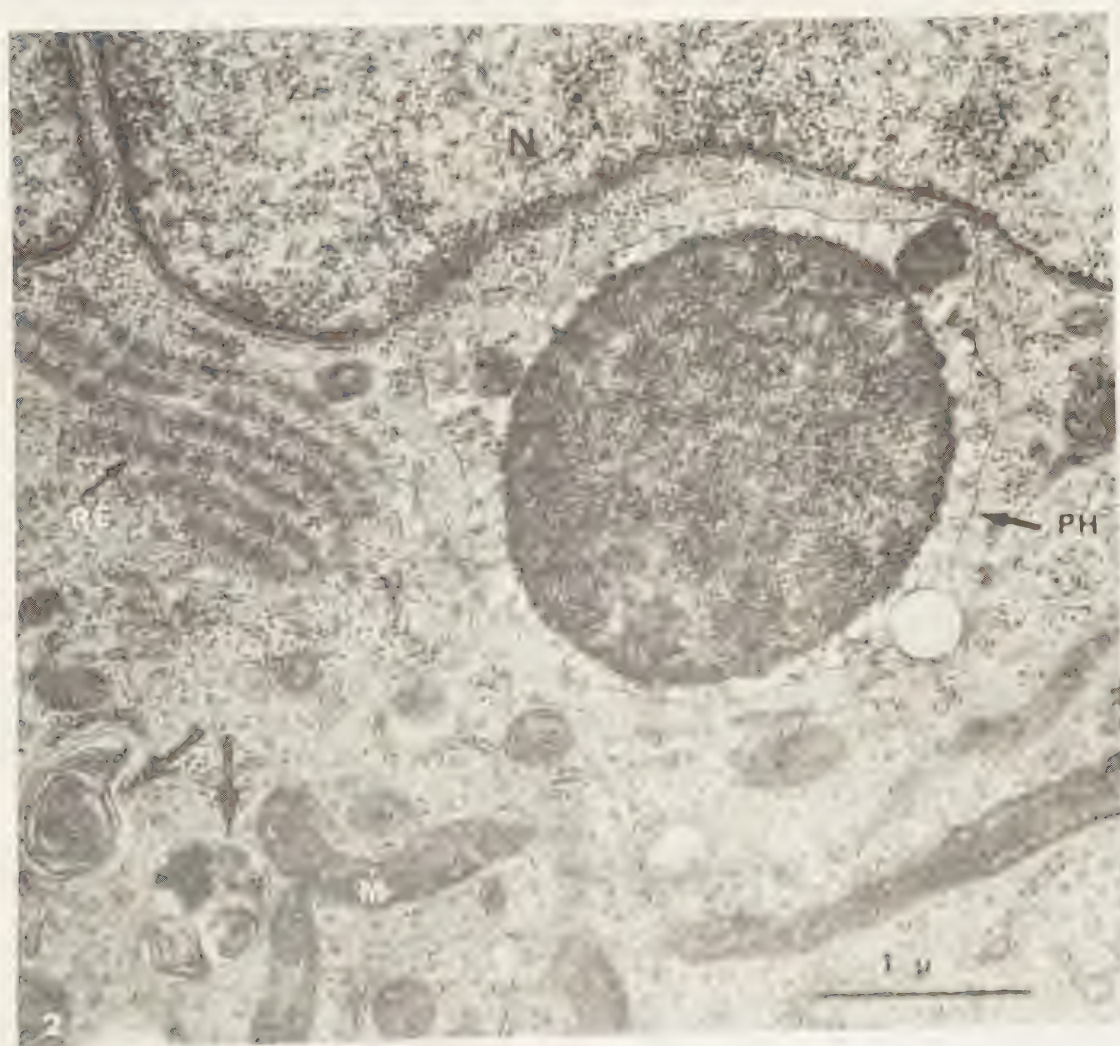
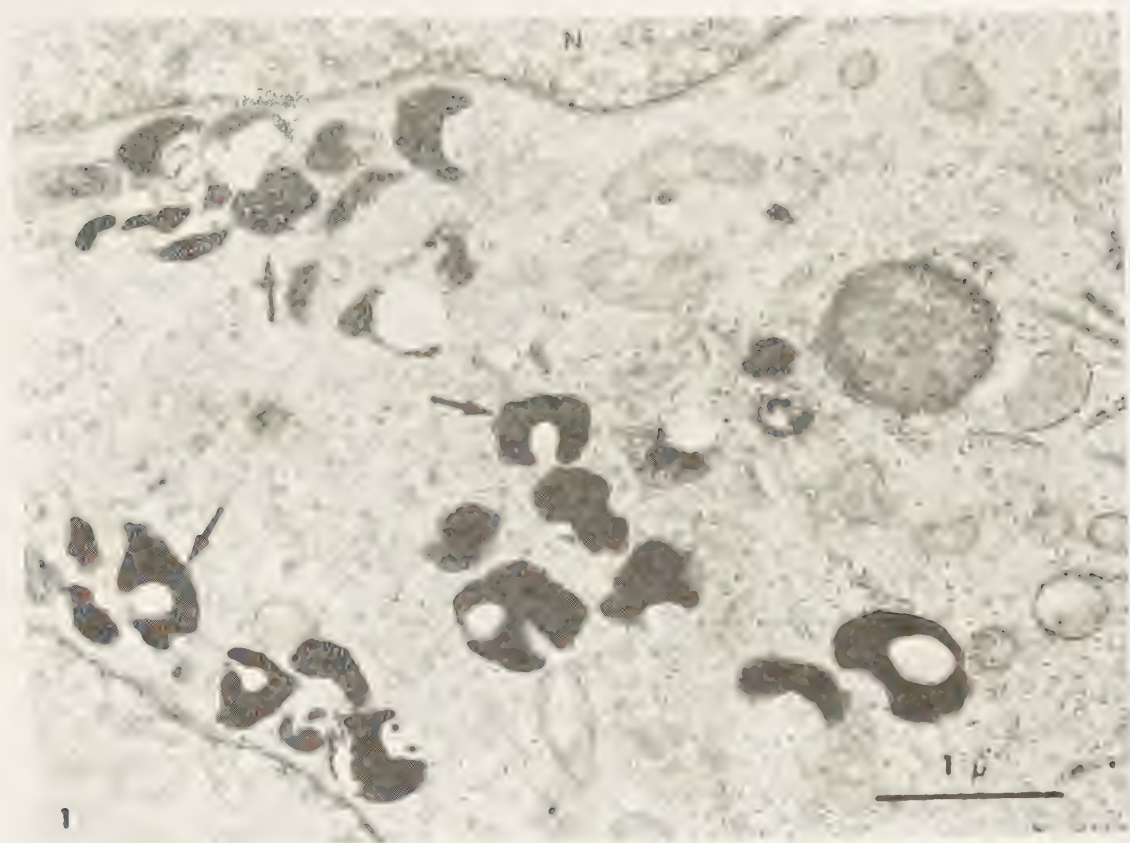


PLANCHE 17

RIFAMYCINE SV 5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Inclusion contenant une forte proportion de corps initiaux pauvres en ribosomes.

X 28750

Fig. 2 - Corps initiaux dont le cytoplasme, pauvre en ribosomes, est déformé et rétracté.

X 34400

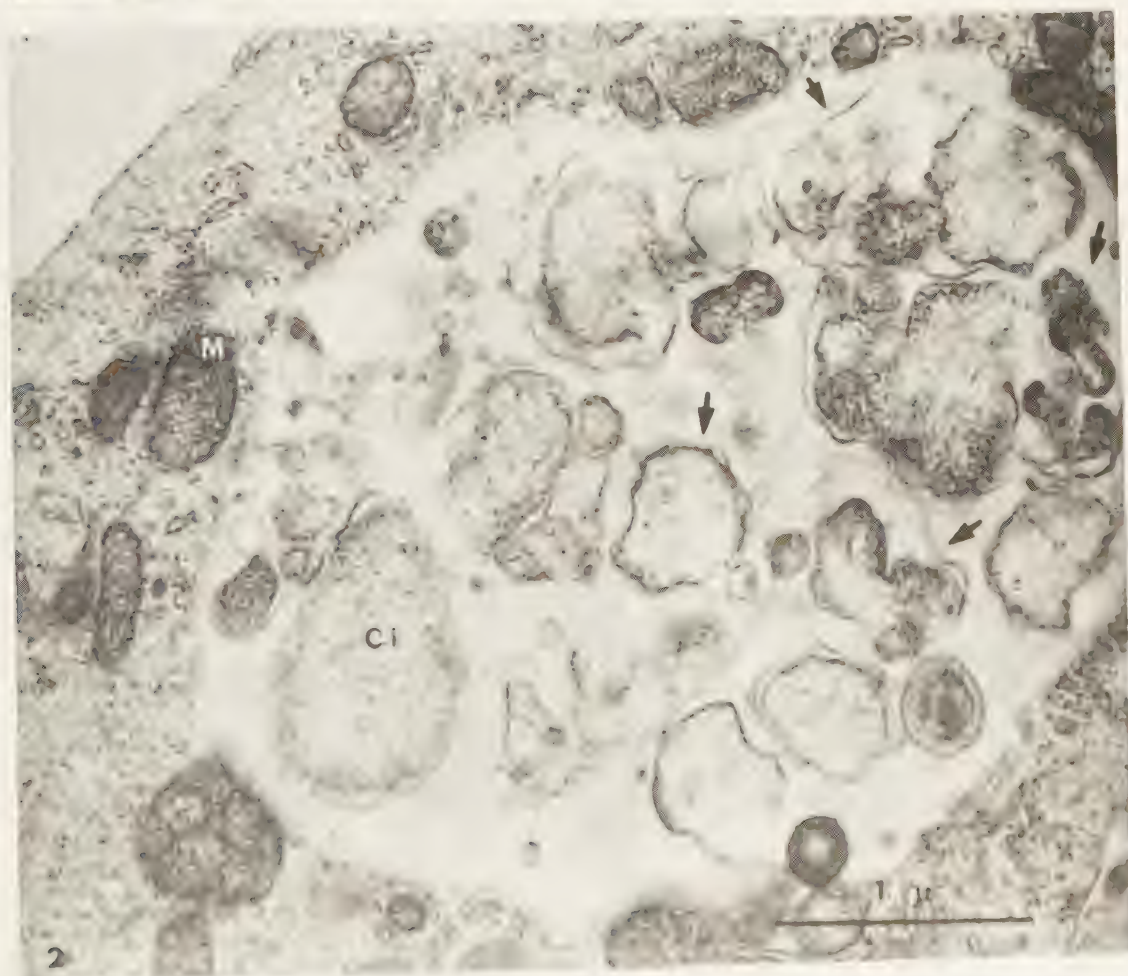
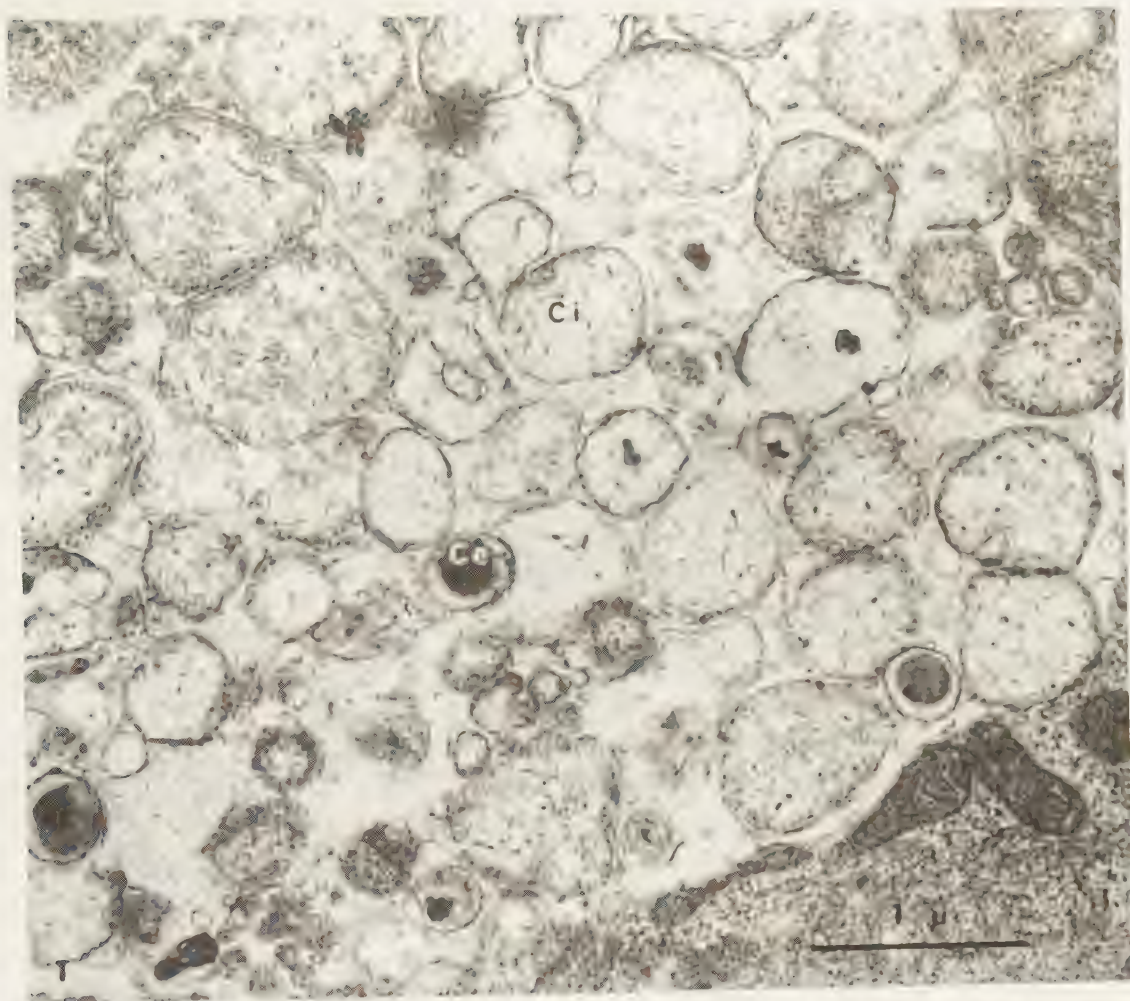
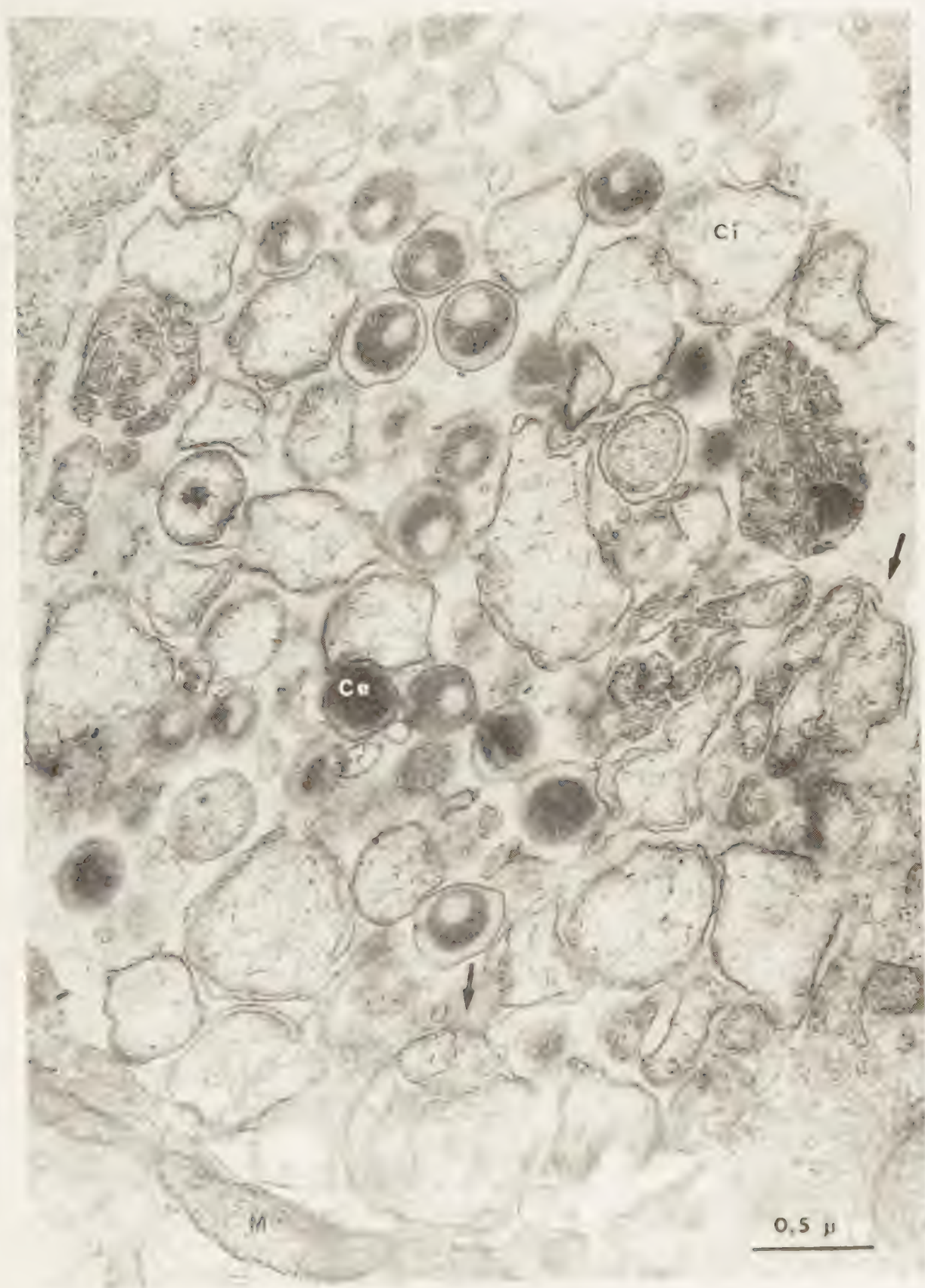


PLANCHE 18

RIFAMYCINE SV 5 $\mu\text{g/ml}$

Grande inclusion contenant des corps élémentaires normaux et des corps initiaux dont le cytoplasme est très déformé et pauvre en ribosomes.

X 43000





C H L O R A M P H E N I C O L

PLANCHE 19

CHLORAMPHENICOL 0,5 μ g/ml

Grande inclusion ; les trois types de particules sont présents mais les corps intermédiaires y existent en proportion importante.

A l'extérieur de l'inclusion des particules chlamydiales se trouvent dans des vacuoles isolées.

X 12600

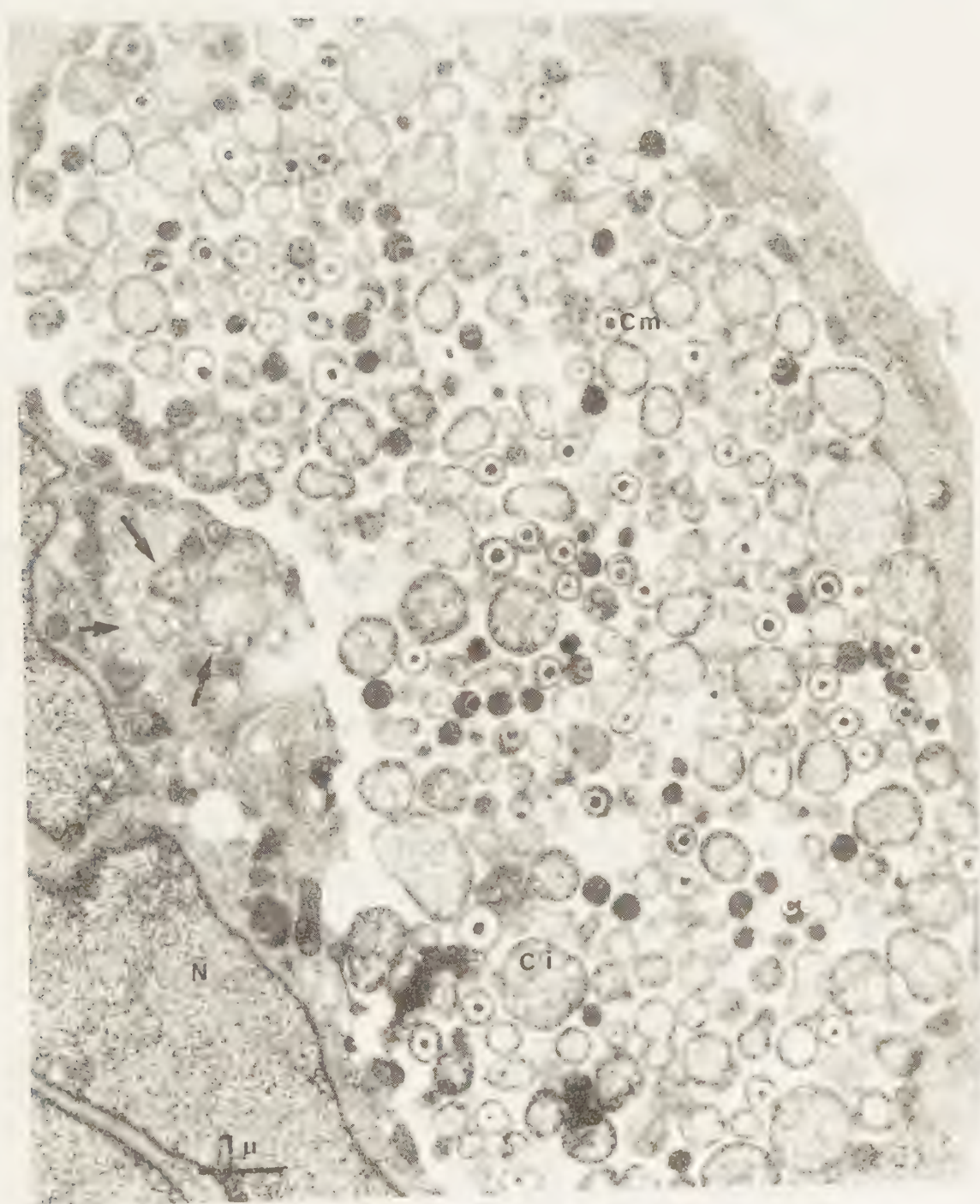


PLANCHE 20

CHLORAMPHENICOL 0,5 µg/ml

Juxtaposition de trois petites inclusions ne contenant que des corps intermédiaires et des corps initiaux. Des mitochondries (M) sont étroitement accolées aux contours des inclusions.

X 16500

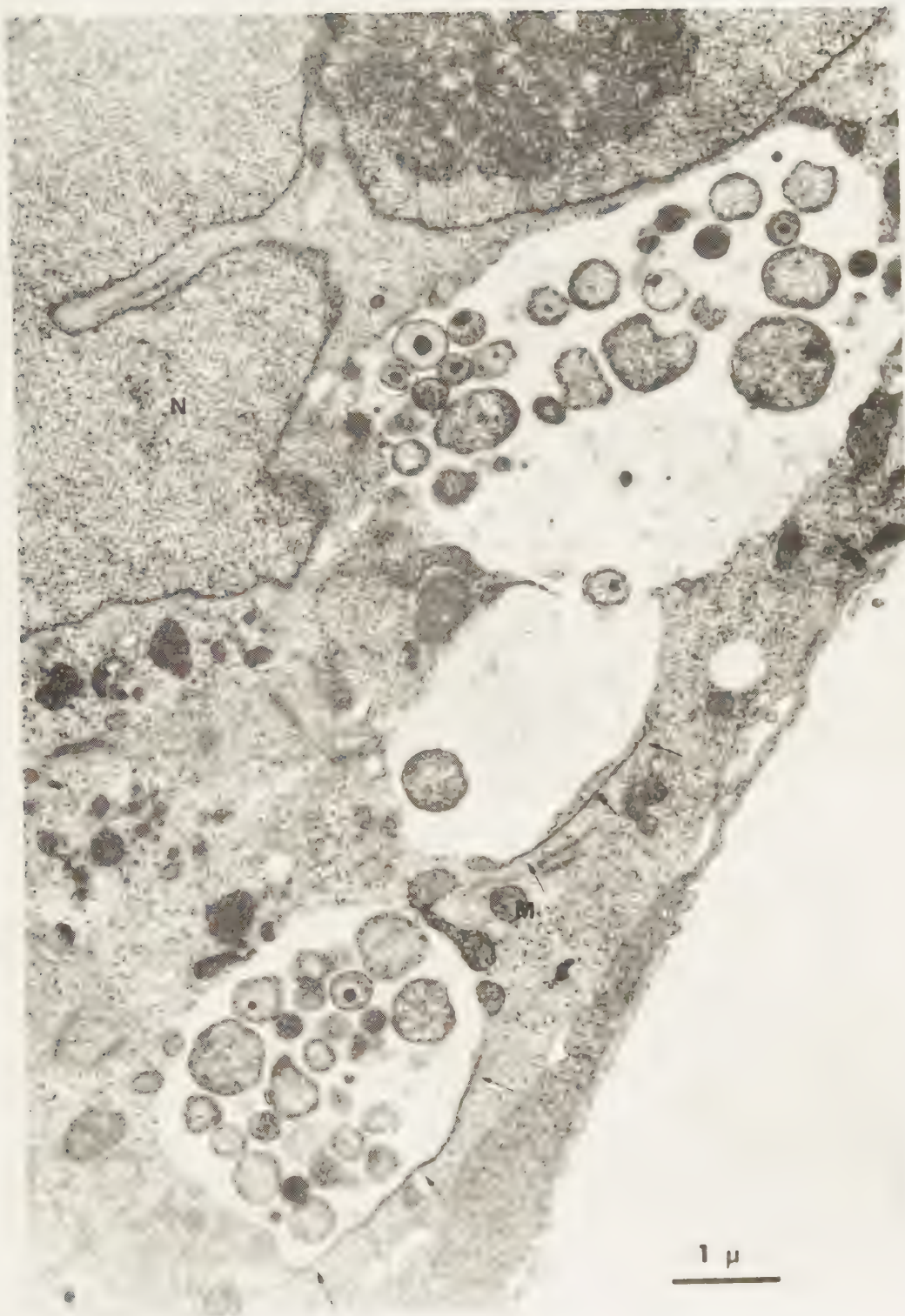


PLANCHE 21

CHLORAMPHENICOL 0,5 $\mu\text{g/ml}$

- Fig. 1* - Un grand nombre d'inclusions ne contient que des corps initiaux. L'un d'eux présente une division anormale.

X 21000

- Fig. 2* - Inclusion renfermant les trois types de particules. Les vacuoles des corps élémentaires contiennent des résidus, très denses aux électrons, identiques à ceux des témoins.

X 16500

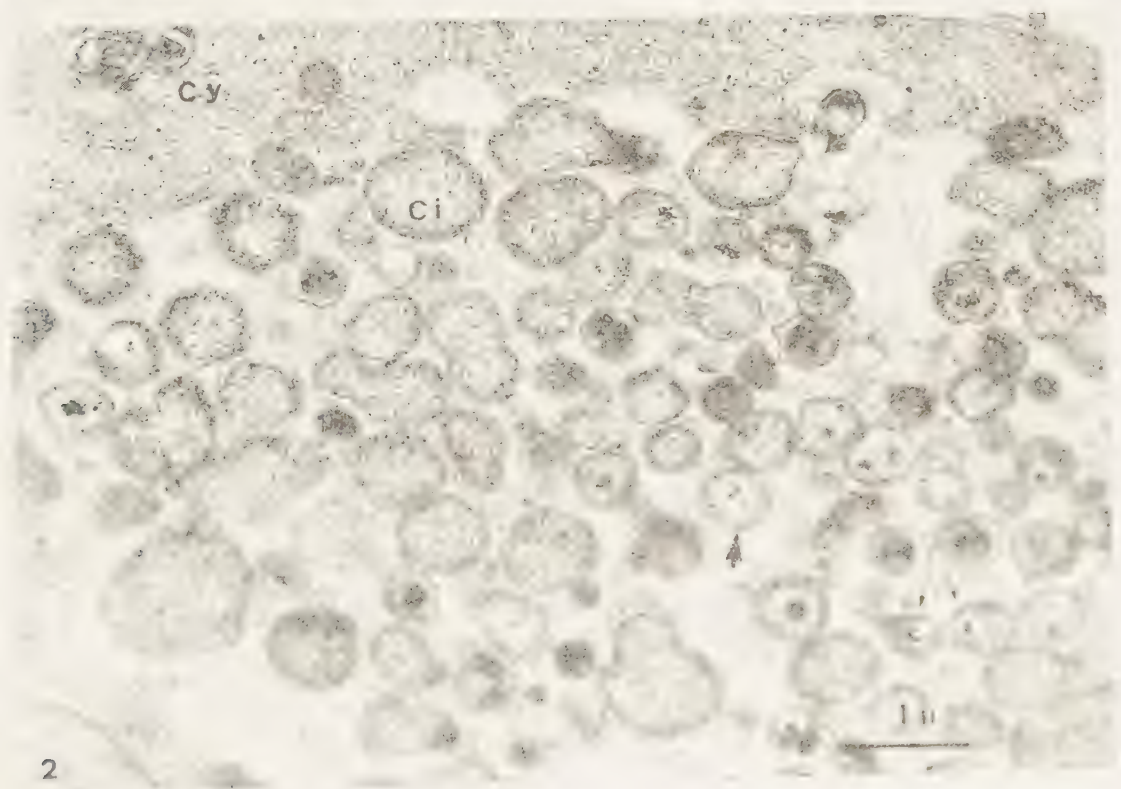
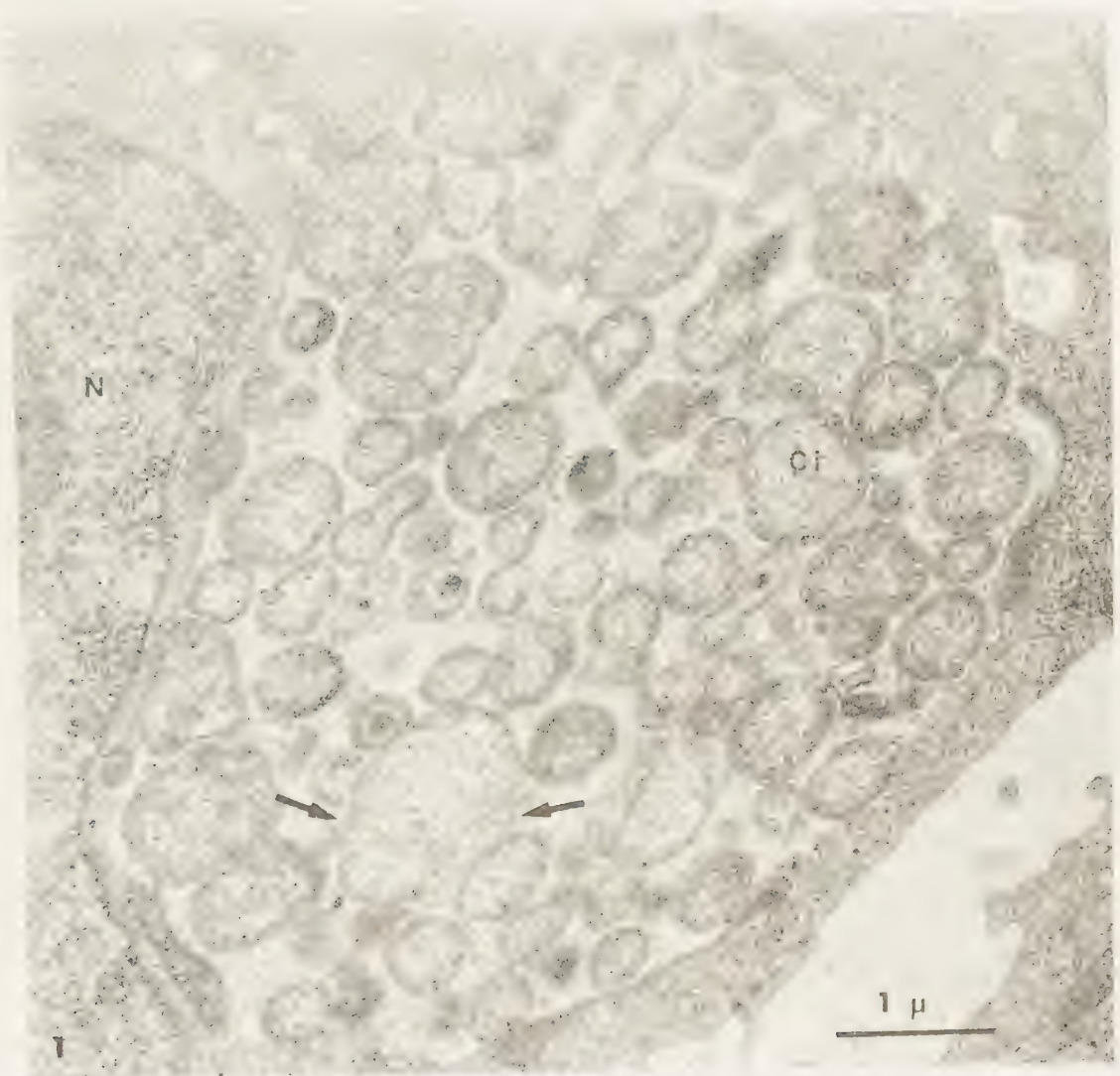


PLANCHE 22

CHLORAMPHENICOL 0,5 $\mu\text{g/ml}$

- Fig. 1 - Inclusion renfermant les trois types de particules. Une matière granuleuse semble éparpillée sur le fond de l'inclusion.
Un corps initial présente une fission anormale.
Des figures lysosomales sont présentes dans le cytoplasme de la cellule-hôte, en bordure de l'inclusion.

X 21000

- Fig. 2 - Corps initiaux. Certains paraissent lysés, libérant leur cytoplasme à l'intérieur de l'inclusion.
Un corps initial géant laisse voir une condensation cytoplasmique.

X 28750

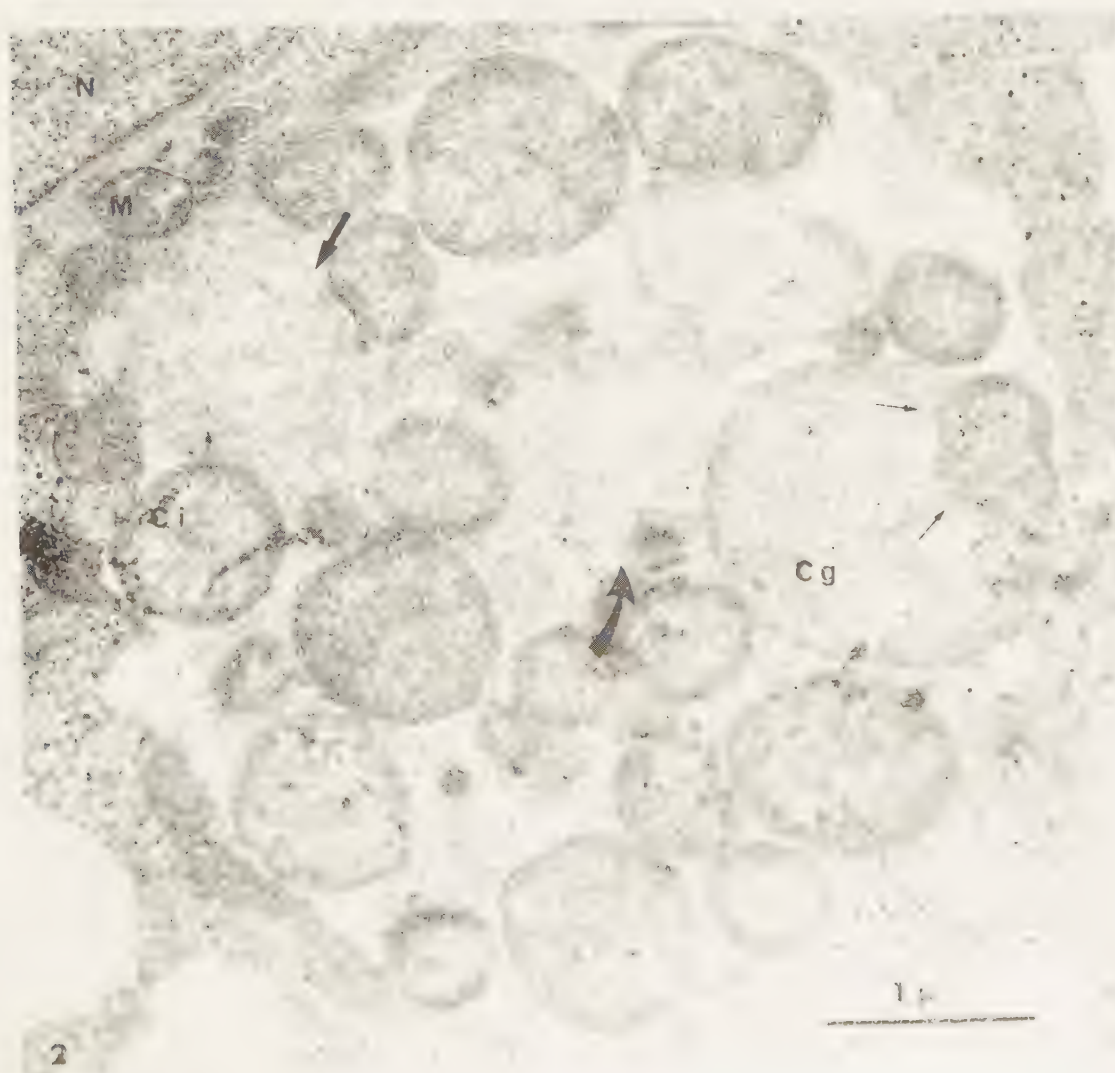
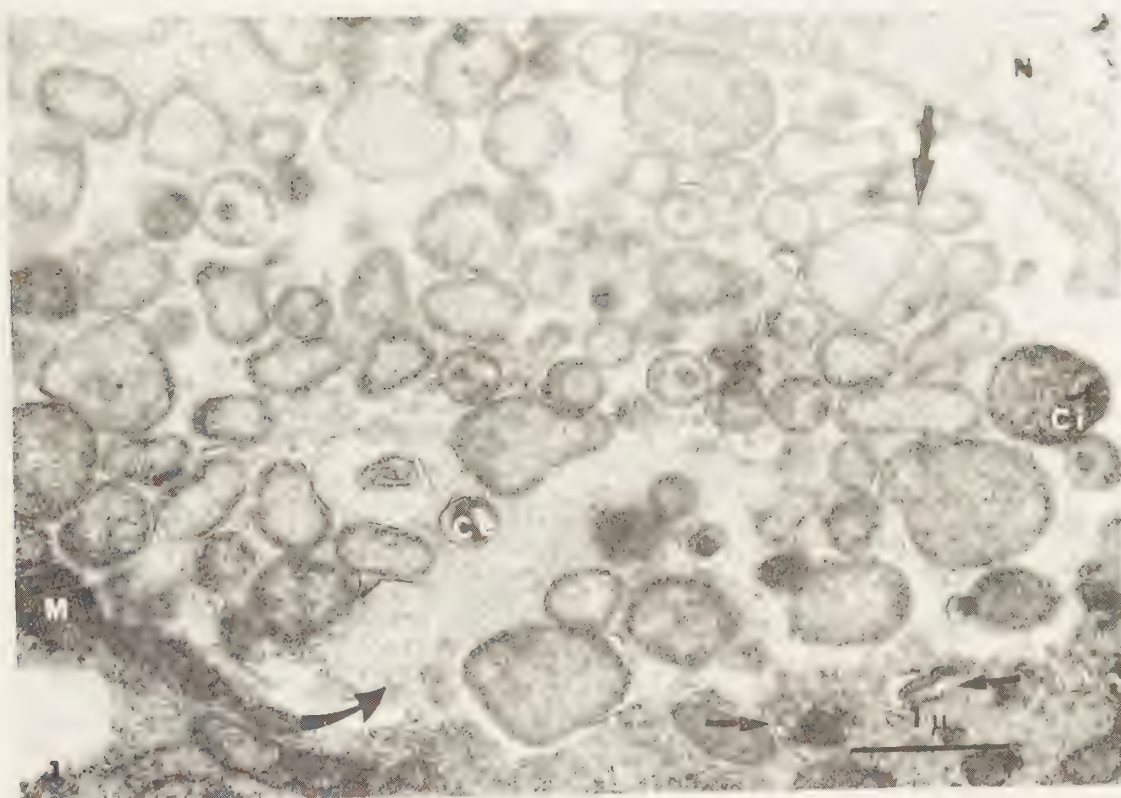


PLANCHE 23

CHLORAMPHENICOL 5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Très petite inclusion ne contenant que des corps initiaux.

X 34400

Fig. 2 - Corps initiaux dont le cytoplasme paraît très chargé en ribosomes.

L'un de ces corps présente une cassure dans son cytoplasme ;
un autre semble lysé.

Des figures lysosomales sont visibles en bordure de l'inclusion.

X 28750

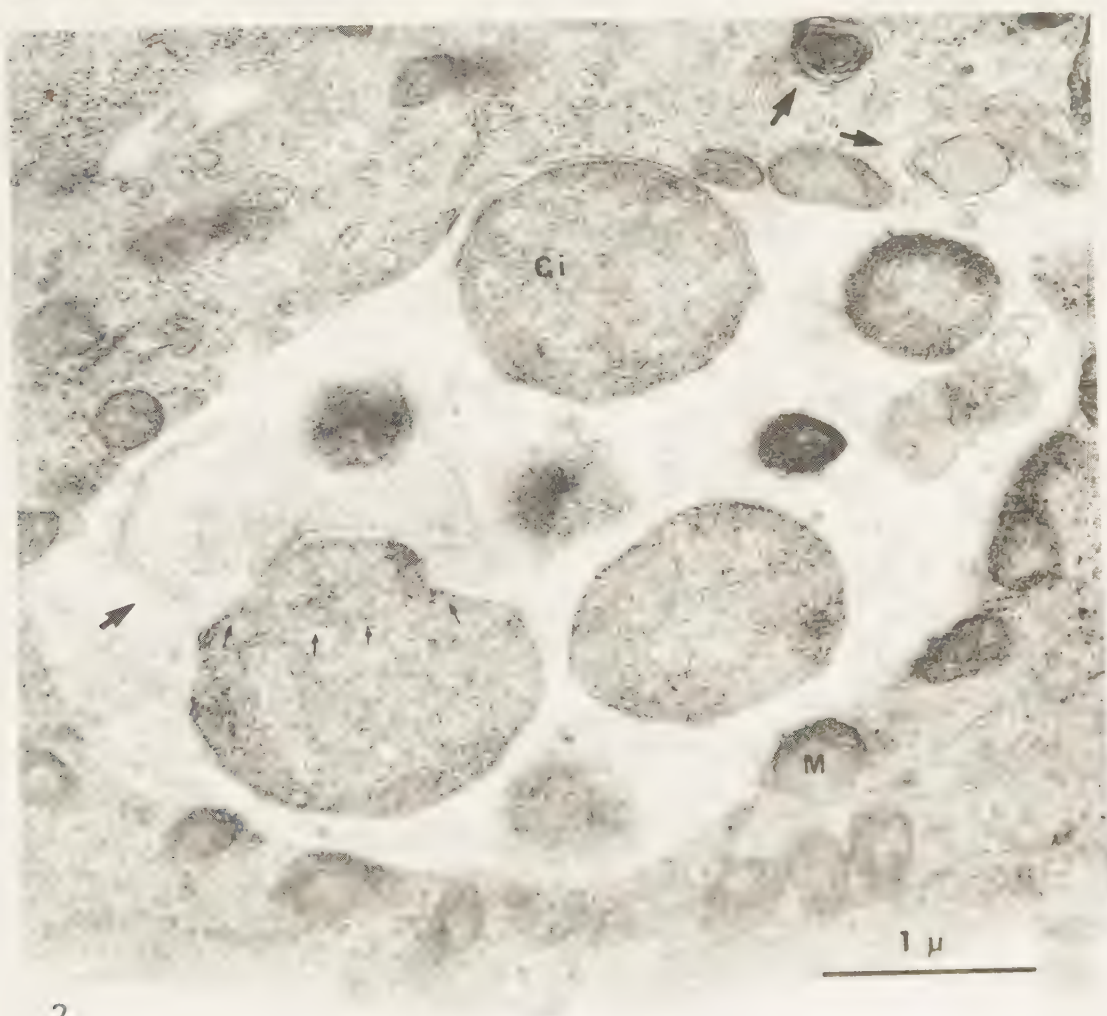
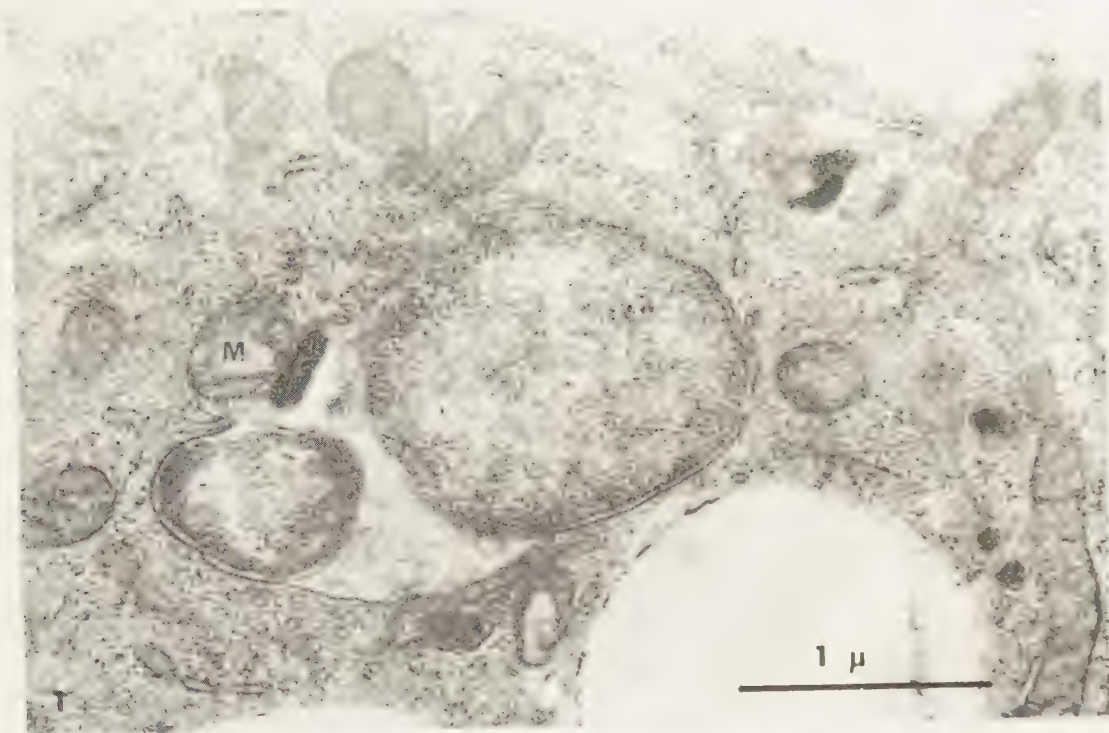


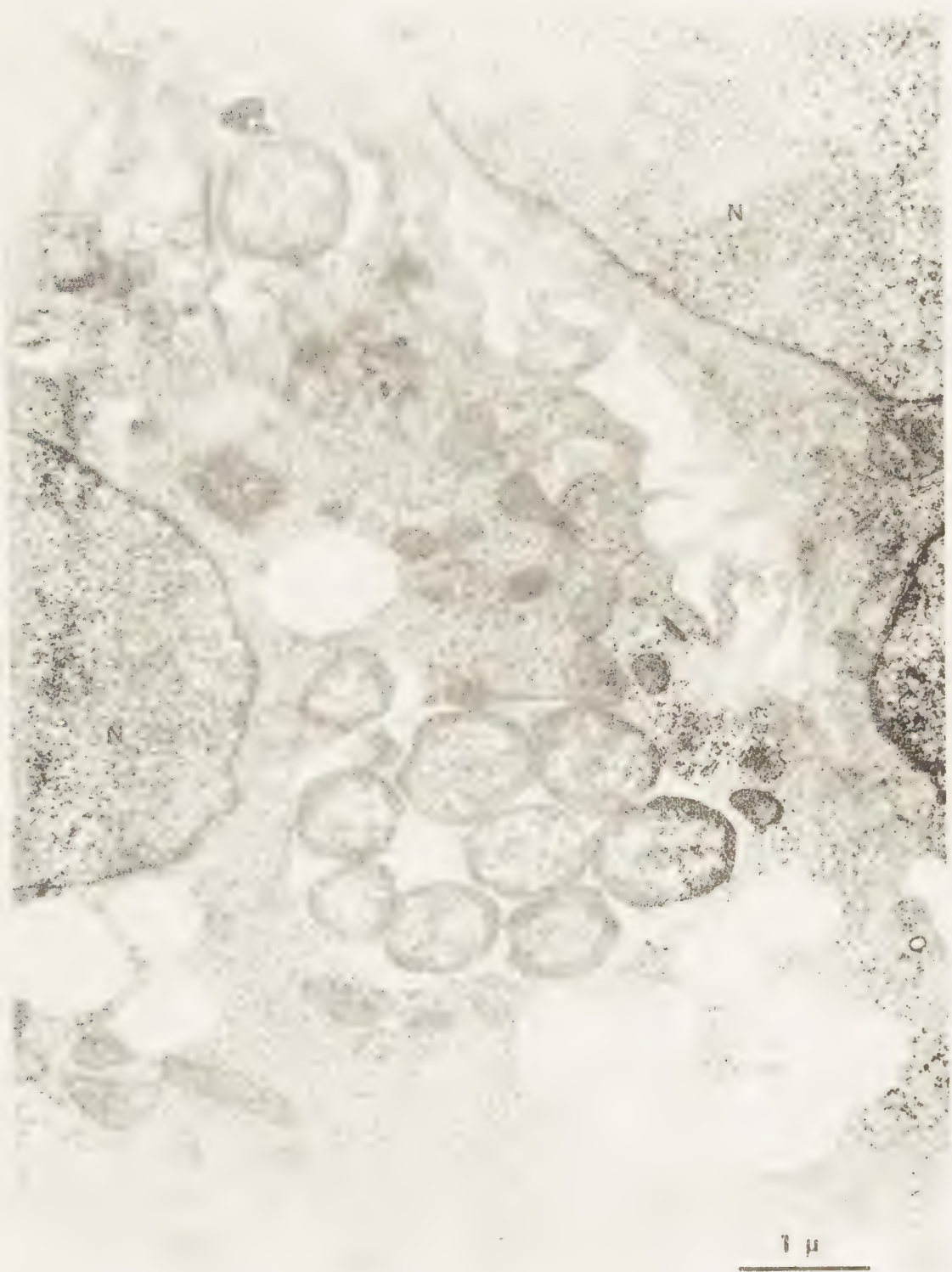
PLANCHE 24

CHLORAMPHENICOL 50 $\mu\text{g/ml}$

Inclusions contenant exclusivement des corps initiaux dont la couronne ribosomale est très dense.

Le cytoplasme de la cellule-hôte est très vacuolisé.

X 21000





G E N T A M I C I N E

PLANCHE 25

GENTAMICINE 0,5 μ g/ml

La plupart des inclusions cultivées en présence de 0,5 μ g/ml de gentamicine renferment des particules normales, bien que sur ce cliché, il existe un corps intermédiaire de grande taille et creusé d'une vacuole. A l'intérieur de l'inclusion certaines images évoquent des lysosomes secondaires.

X 21000

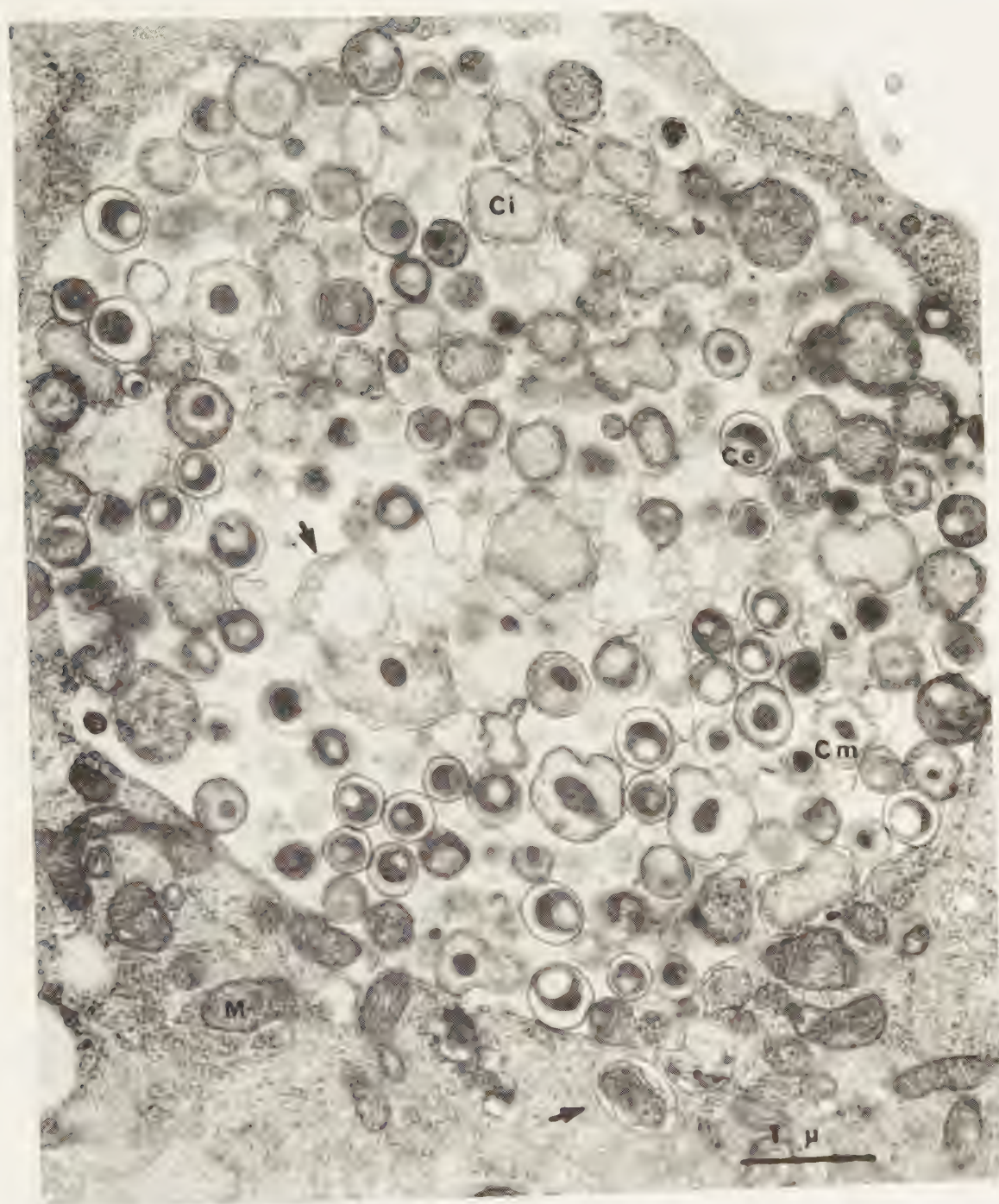


PLANCHE 26

GENTAMICINE 5 μ g/ml

Quelques rares inclusions contiennent des corps initiaux dont le cytoplasme bourgeonne très intensément. Plusieurs d'entre eux présentent des fissions anormales.

X 10325

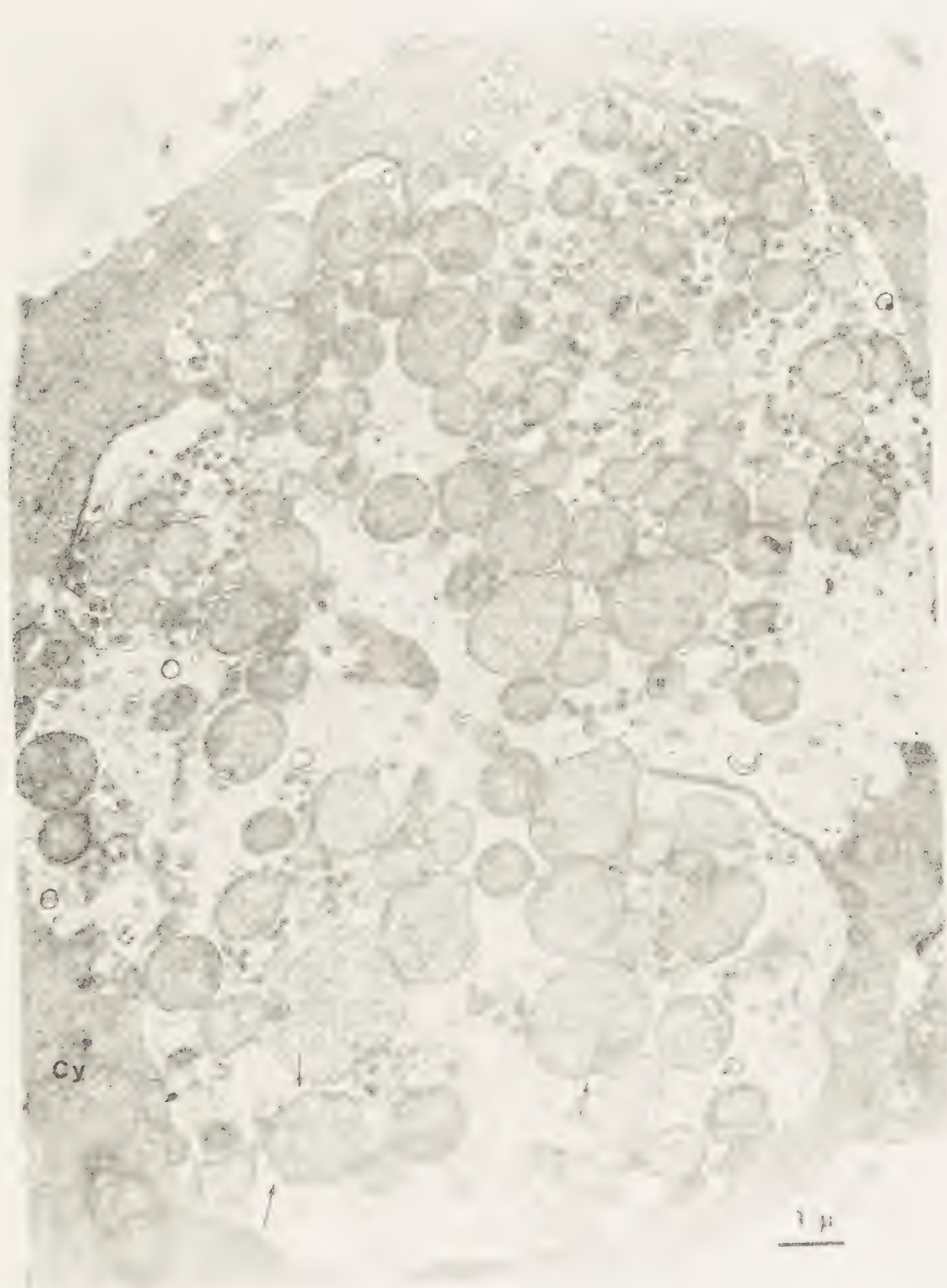


PLANCHE 27

GENTAMICINE 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Corps initial géant creusé d'une énorme vacuole. A proximité de cette vacuole le cytoplasme est altéré.

X 28750

Fig. 2 - Inclusion normale ; deux corps intermédiaires achèvent de se diviser.

X 21000

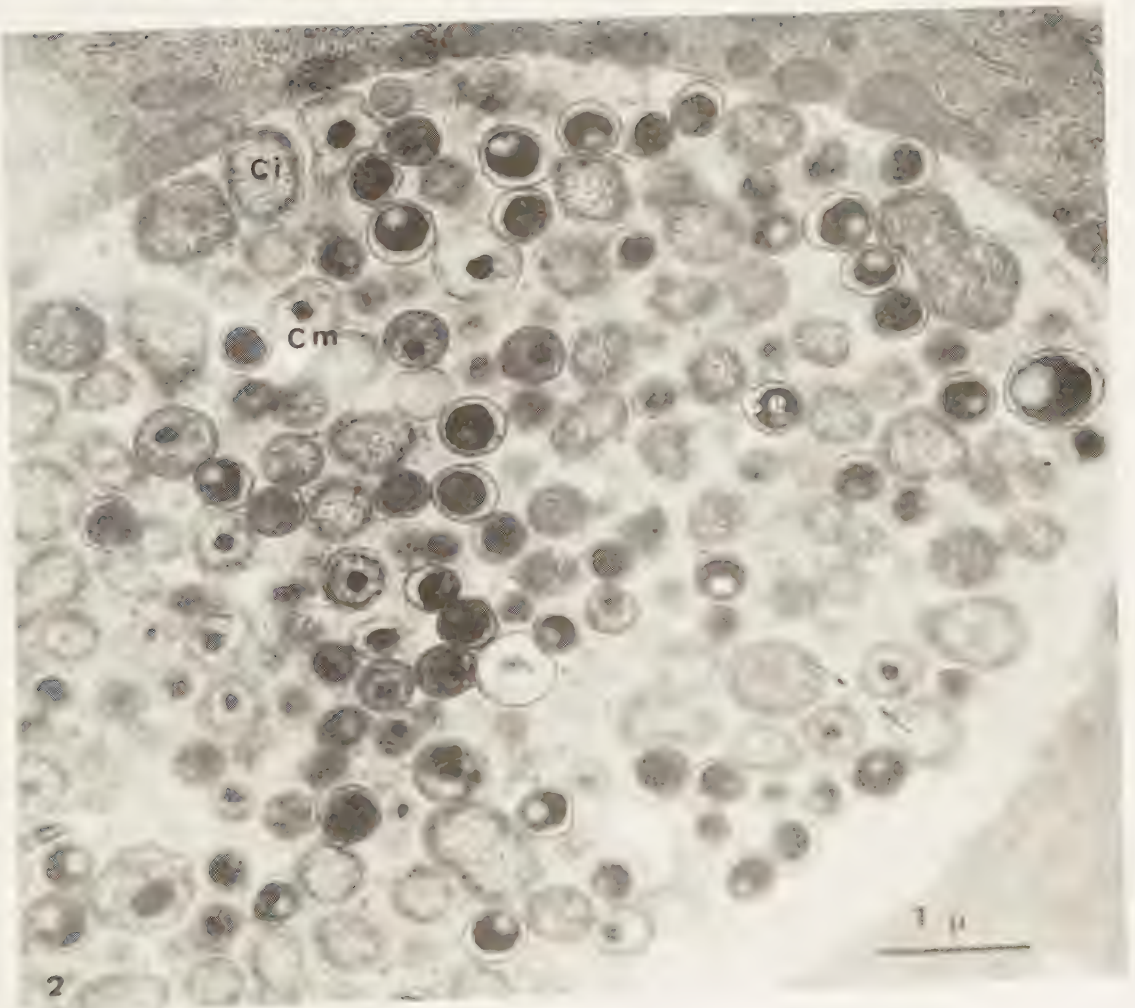
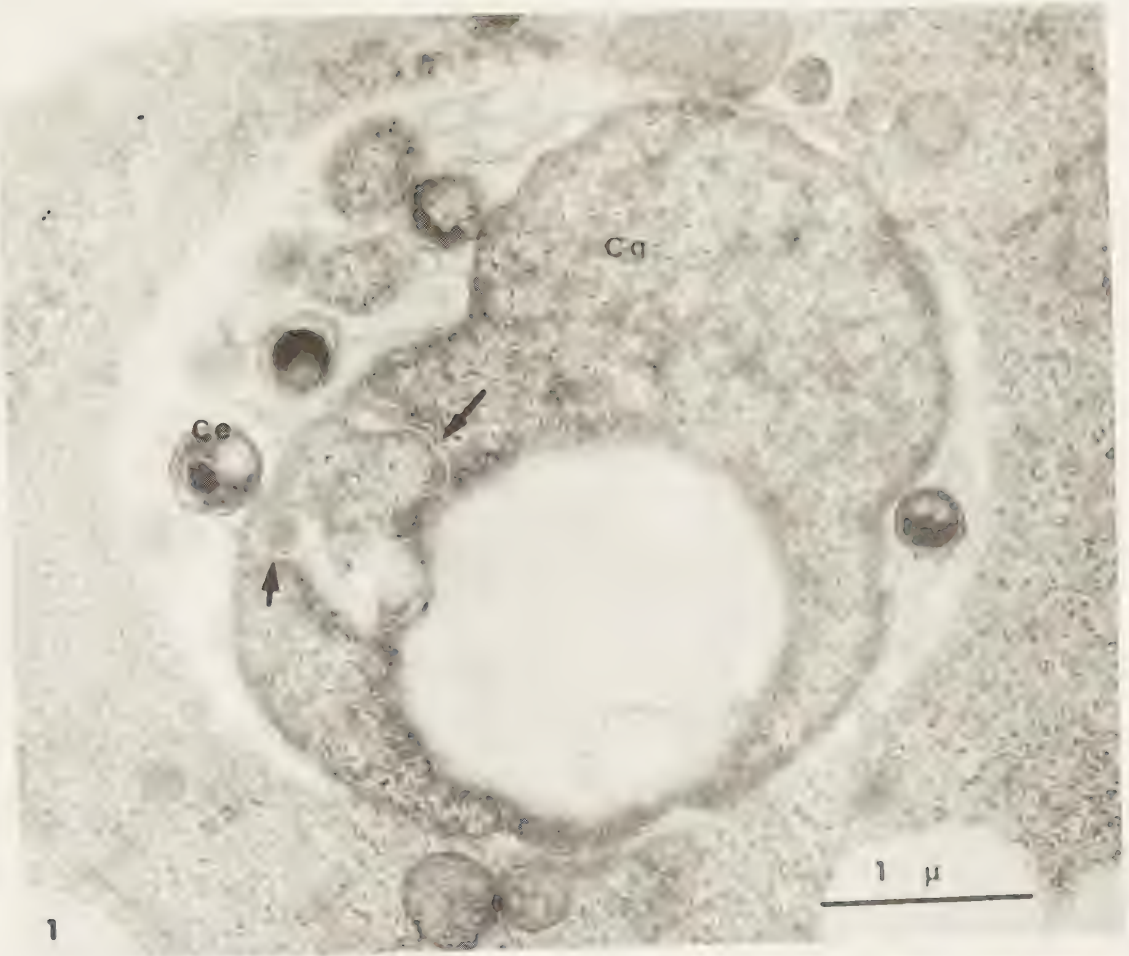


PLANCHE 28

GENTAMICINE 500 $\mu\text{g/ml}$

Inclusion de taille moyenne ne contenant que des corps initiaux dont un grand nombre bourgeonne. L'un d'eux semble se lyser.

X 28750

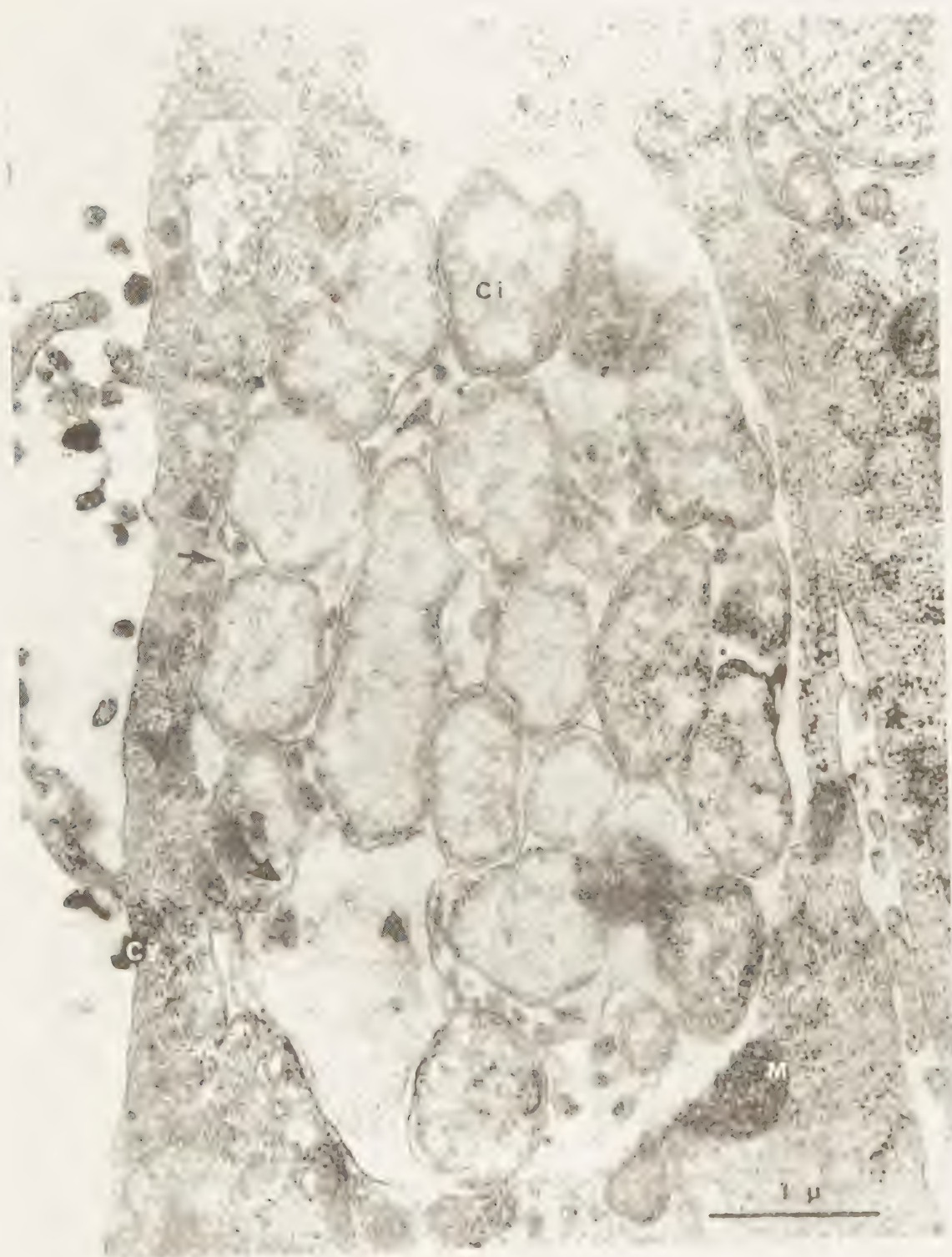


PLANCHE 29

GENTAMICINE 500 $\mu\text{g/ml}$

Corps initiaux : certains ont une taille supérieure à la normale ; d'autres ont un cytoplasme rétracté.

Le cytoplasme de la cellule-hôte apparaît entre ces corps.

X 28750

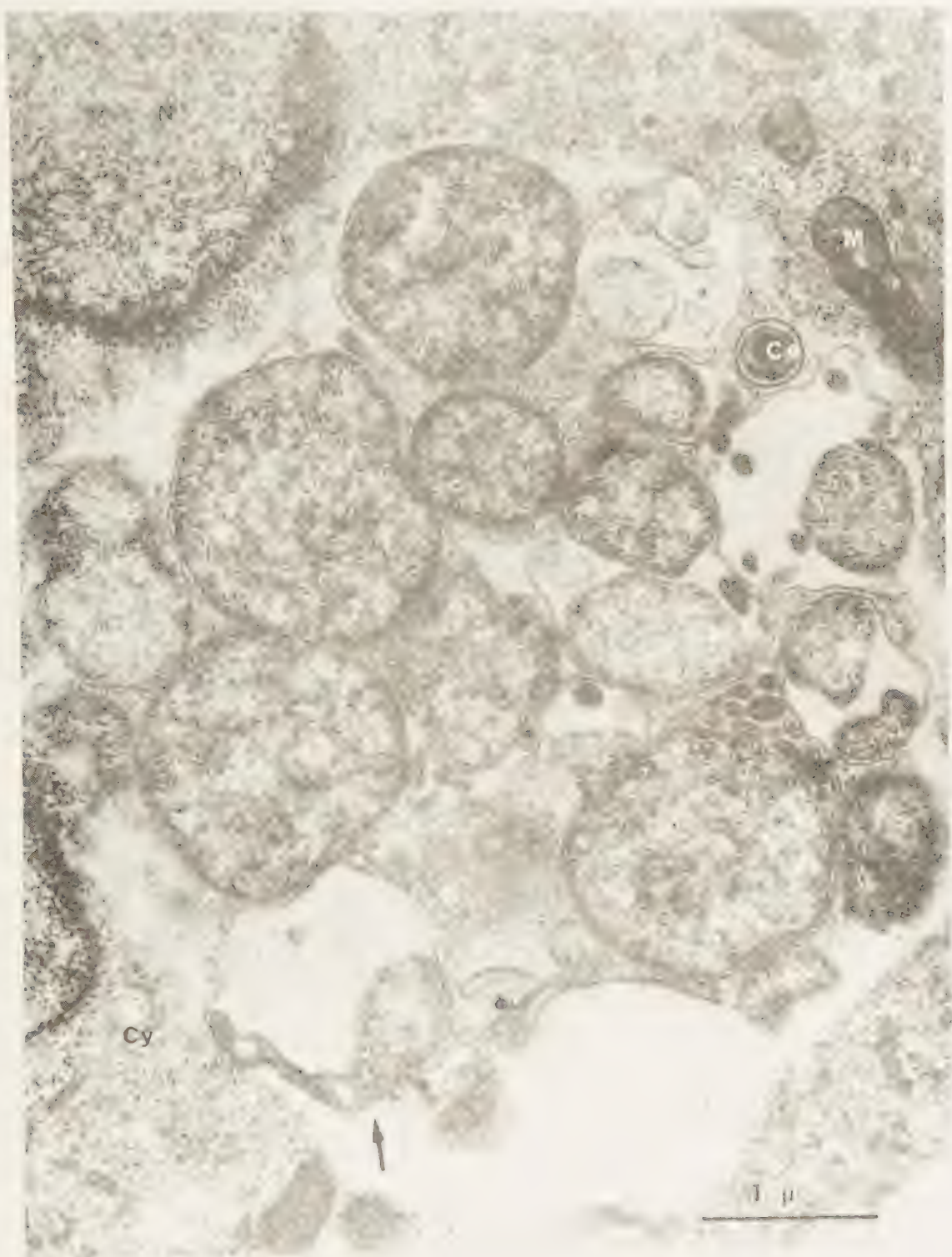


PLANCHE 30

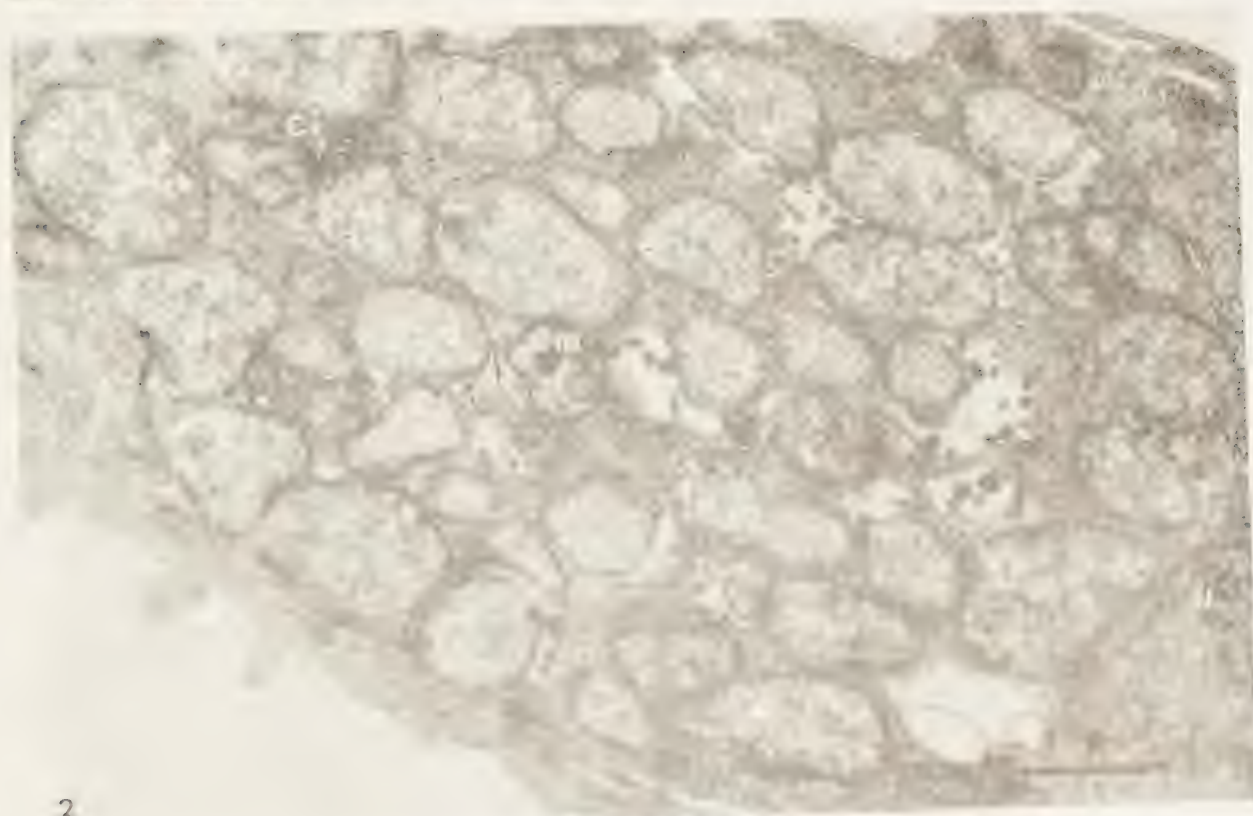
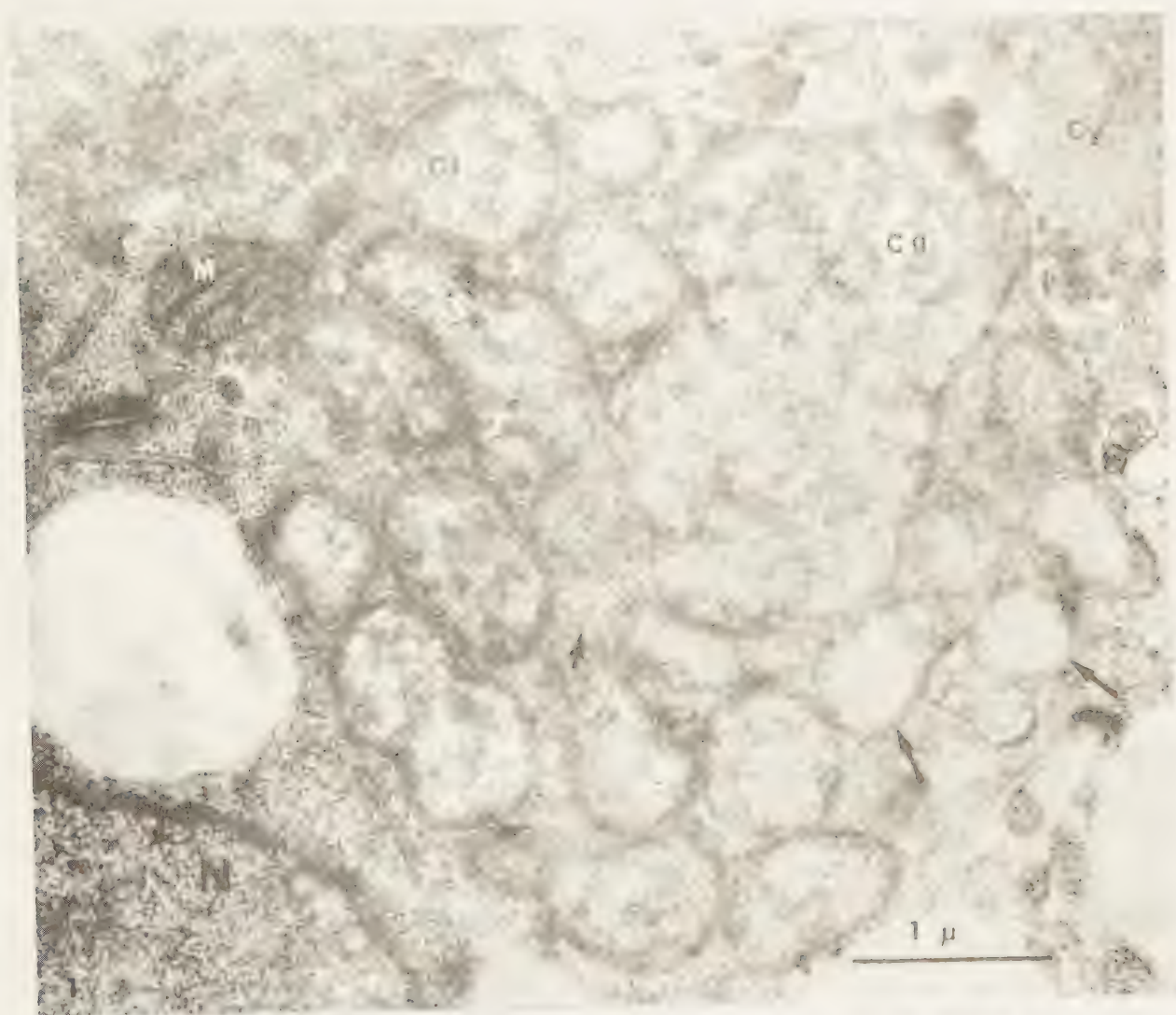
GENTAMICINE 500 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Les corps initiaux semblent s'être multipliés de manière diffuse dans le cytoplasme de la cellule-hôte ; aucune limite vacuolaire n'est visible ; le cytoplasme de la cellule apparaît entre les particules.

X 28750

Fig. 2 - Le cytoplasme de la cellule-hôte est visible entre les particules.

X 19800





S T R E P T O M Y C I N E

PLANCHE 31

STREPTOMYCINE 500 µg/ml

- Fig. 1 - La majorité des inclusions sont normales. Les trois types de particules coexistent.
Pourtant quelques corps initiaux présentent une vacuole à proximité de la membrane cytoplasmique réalisant une image en "anse".*

X 43000

- Fig. 2 - Quelques inclusions contiennent une forte proportion de corps intermédiaires.*

X 21000

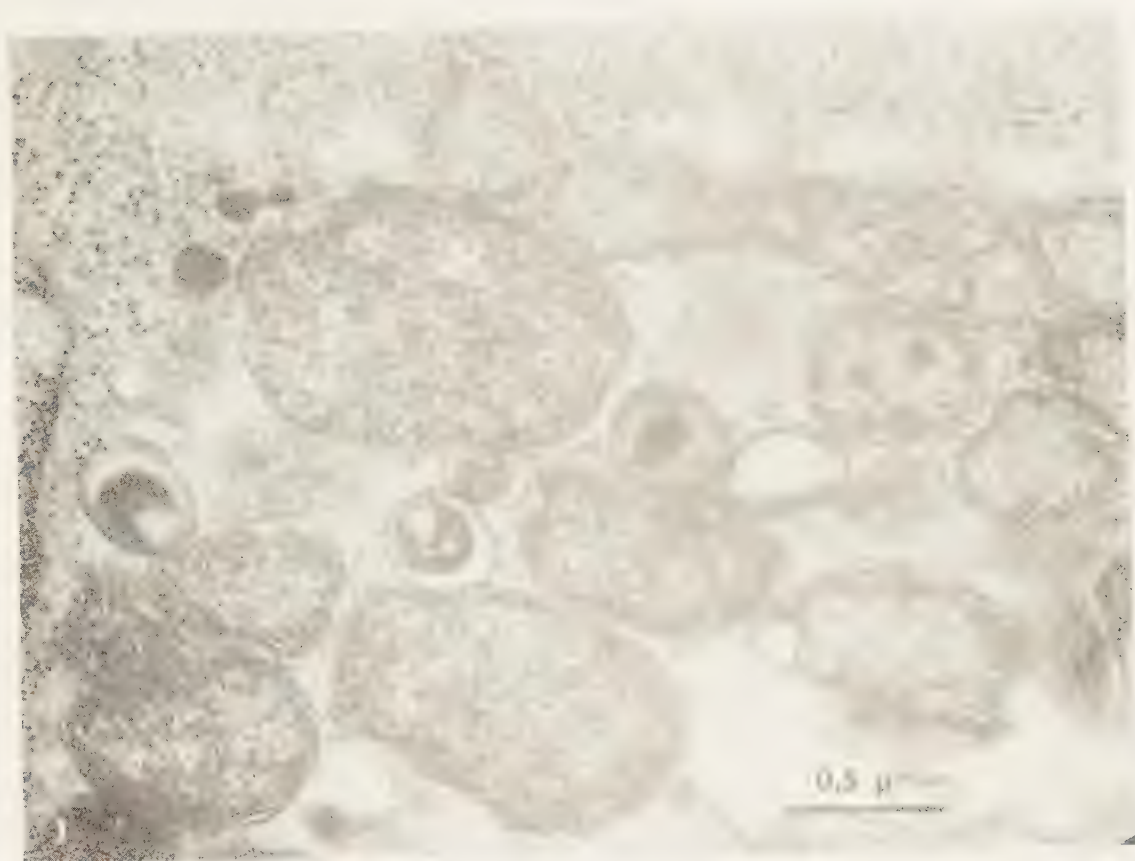


PLANCHE 32

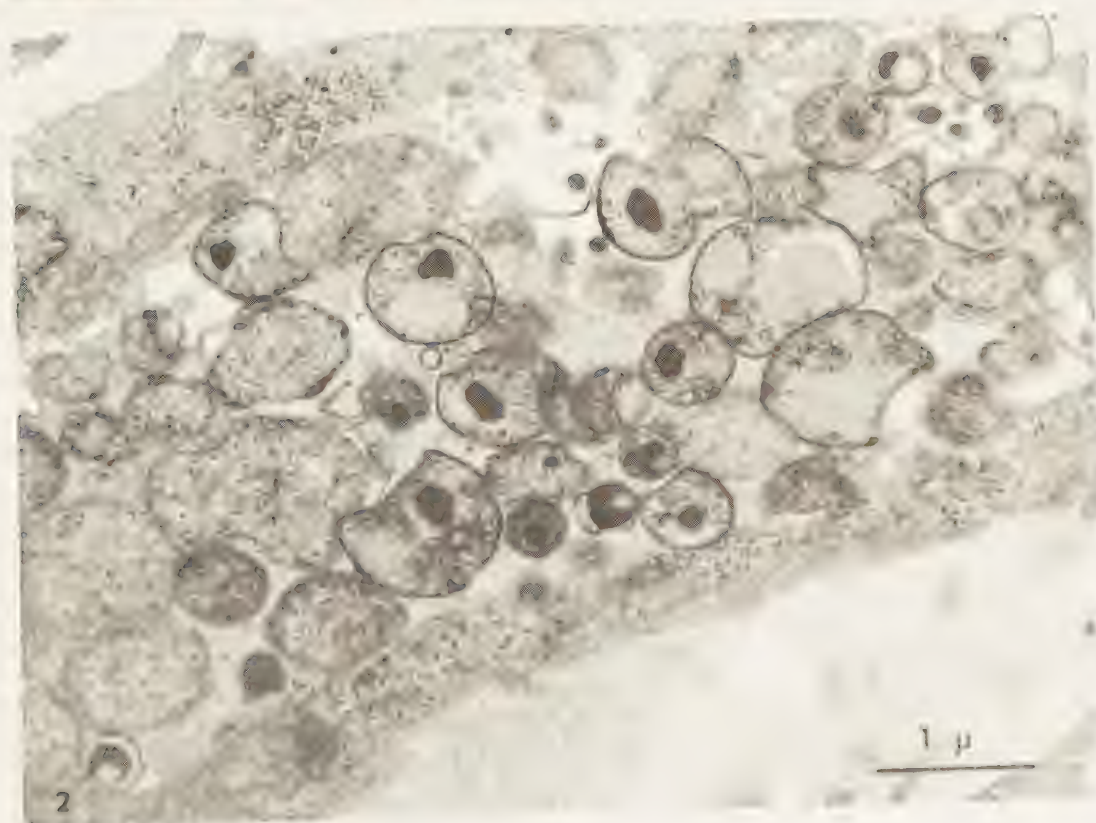
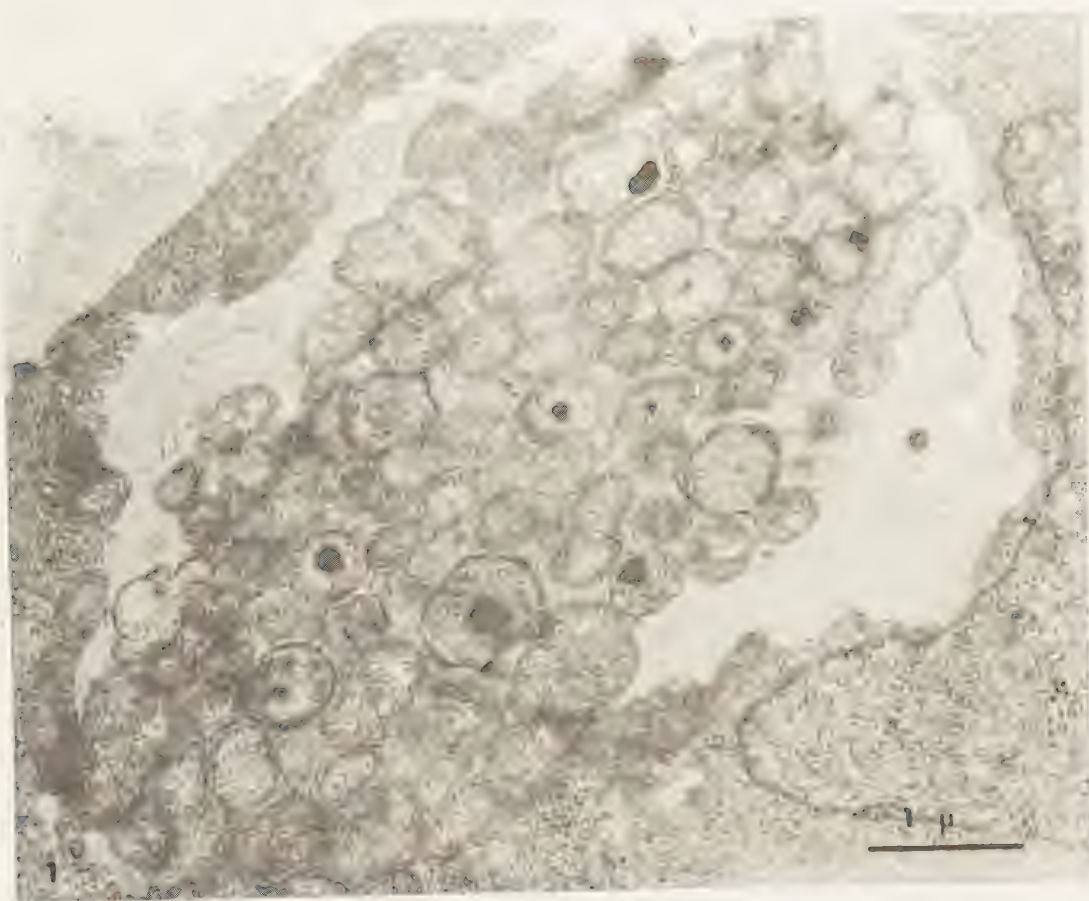
STREPTOMYCINE 500 µg/ml

Fig. 1 - Inclusion avec corps initiaux.

X 21000

Fig. 2 - Nombreux corps intermédiaires creusés d'une vacuole au sein d'une inclusion.

X 21000





P E N I C I L L I N E

PLANCHE 33

PENICILLINE 5 μ g/ml

Microscopie optique

Fig. 1 - Corps géants

X 3500

Fig. 2 - Inclusion contenant des corps géants mêlés à des particules de taille normale.

X 3500

Microscopie électronique

*Fig. 3 - Corps géants dont le cytoplasme bourgeonne intensément ; les parois très souples se déforment facilement.
Il existe des corps élémentaires normaux.*

X 21000

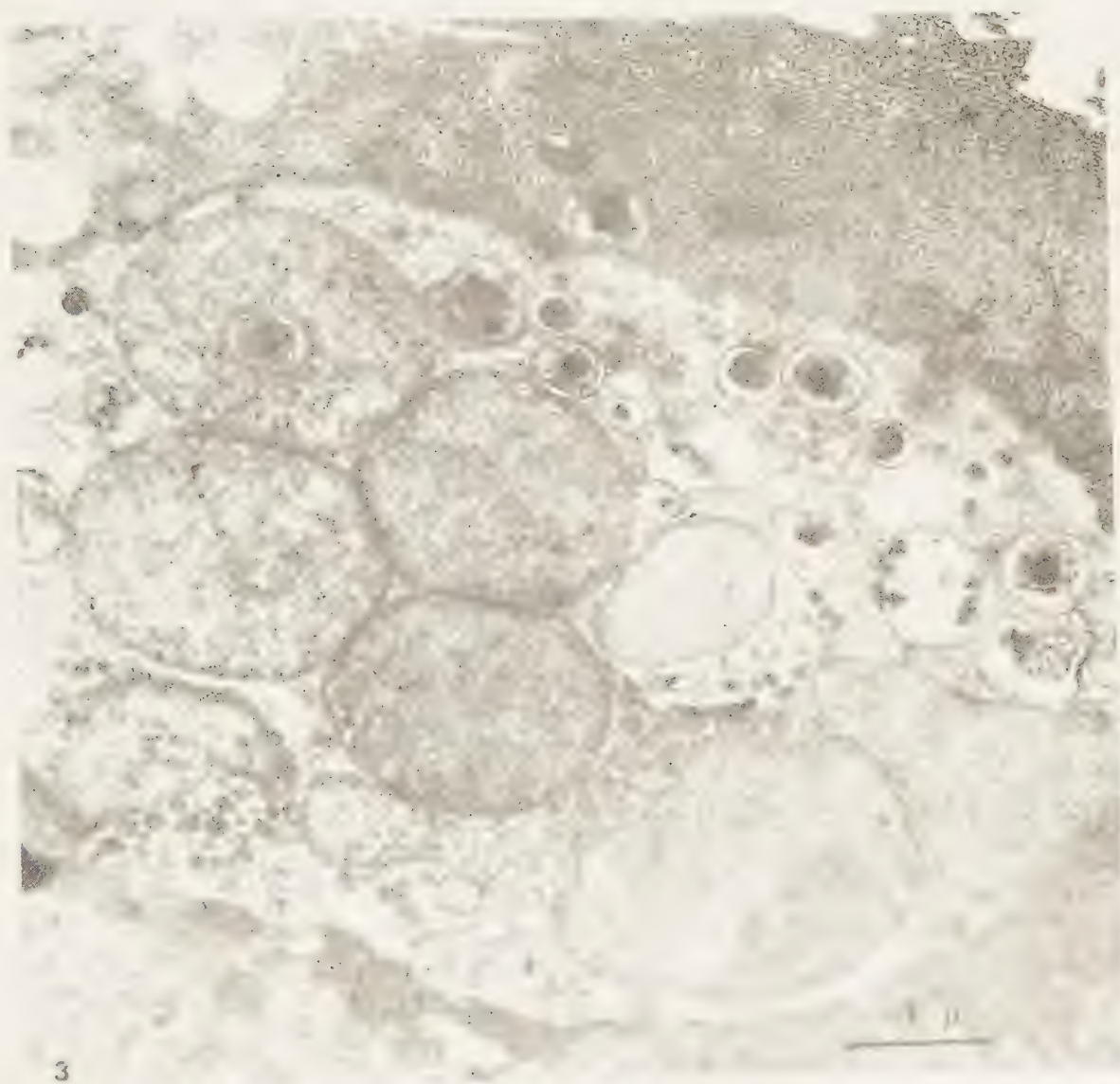


PLANCHE 34

PENICILLINE 5 μ g/ml

*Corps initiaux géants ; le cytoplasme se déforme et se rétracte.
L'un d'entre eux présente une fissure cytoplasmique.
Les parois ondulent et de nombreux cercles membranaires sont visibles à
l'intérieur de l'inclusion.*

X 28750

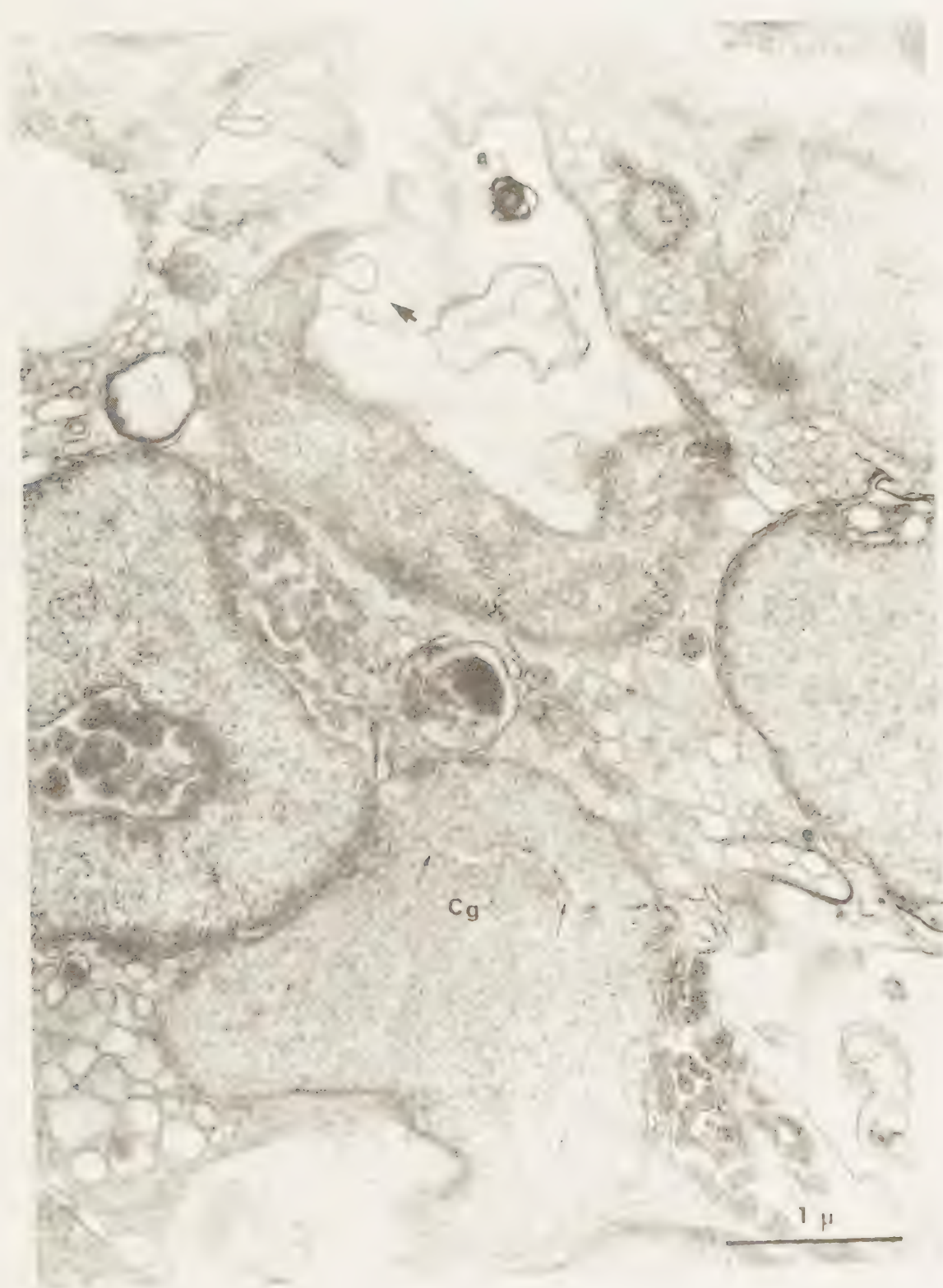


PLANCHE 35

PENICILLINE 5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Agrandissement d'un fragment de la figure 2.

Les épaissements observés au niveau de la paroi de certains corps initiaux résultent de l'étroit accollement des parois et membranes cytoplasmiques de deux corps très proches.

Présence d'un tubule cytoplasmique à proximité des enveloppes.

X 127650

Fig. 2 - Corps initial géant dont le cytoplasme a subi des distorsions.

Sur la partie gauche du cliché on distingue nettement les parois et membranes des deux corps qui se séparent.

X 28750

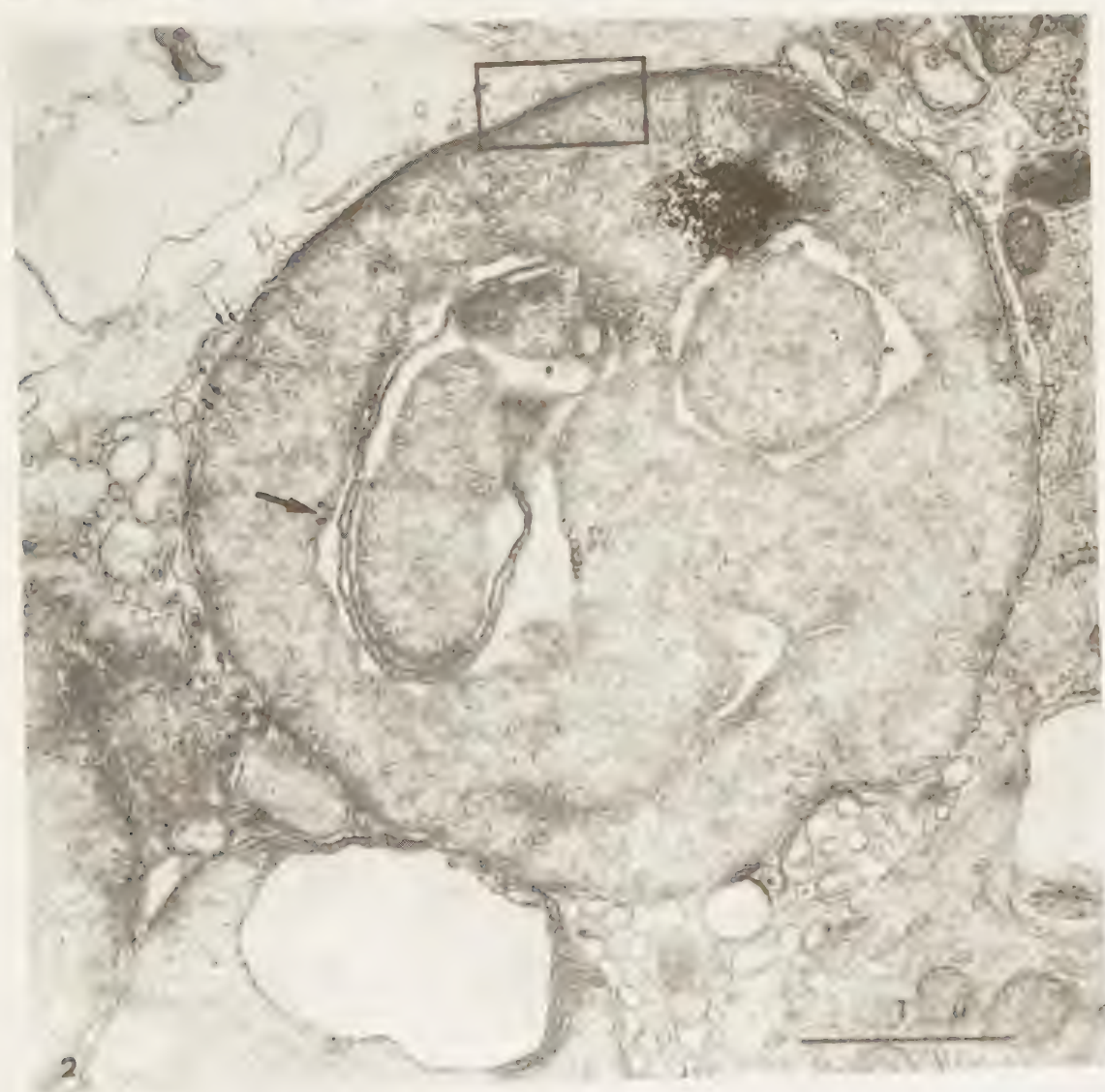


PLANCHE 36

Fig. 1 - *PENCILLINE* 5 $\mu\text{g/ml}$

Corps géant isolé. Le fragment de cytoplasme est entouré d'un système membranaire au centre de ce corps ; des vacuoles sont creusées à la périphérie.

Noter la présence de nombreux cercles membranaires à l'intérieur de la vacuole d'inclusion.

X 23000

Fig. 2 - *PENICILLINE* 50 $\mu\text{g/ml}$

Inclusion anormale contenant des corps géants et des systèmes membranaires. Une des particules, située sur la partie droite du cliché, paraît se lyser : son cytoplasme est très clairsemé et ses enveloppes mal délimitées ; une invagination de la membrane est visible à la partie supérieure.

X 16800

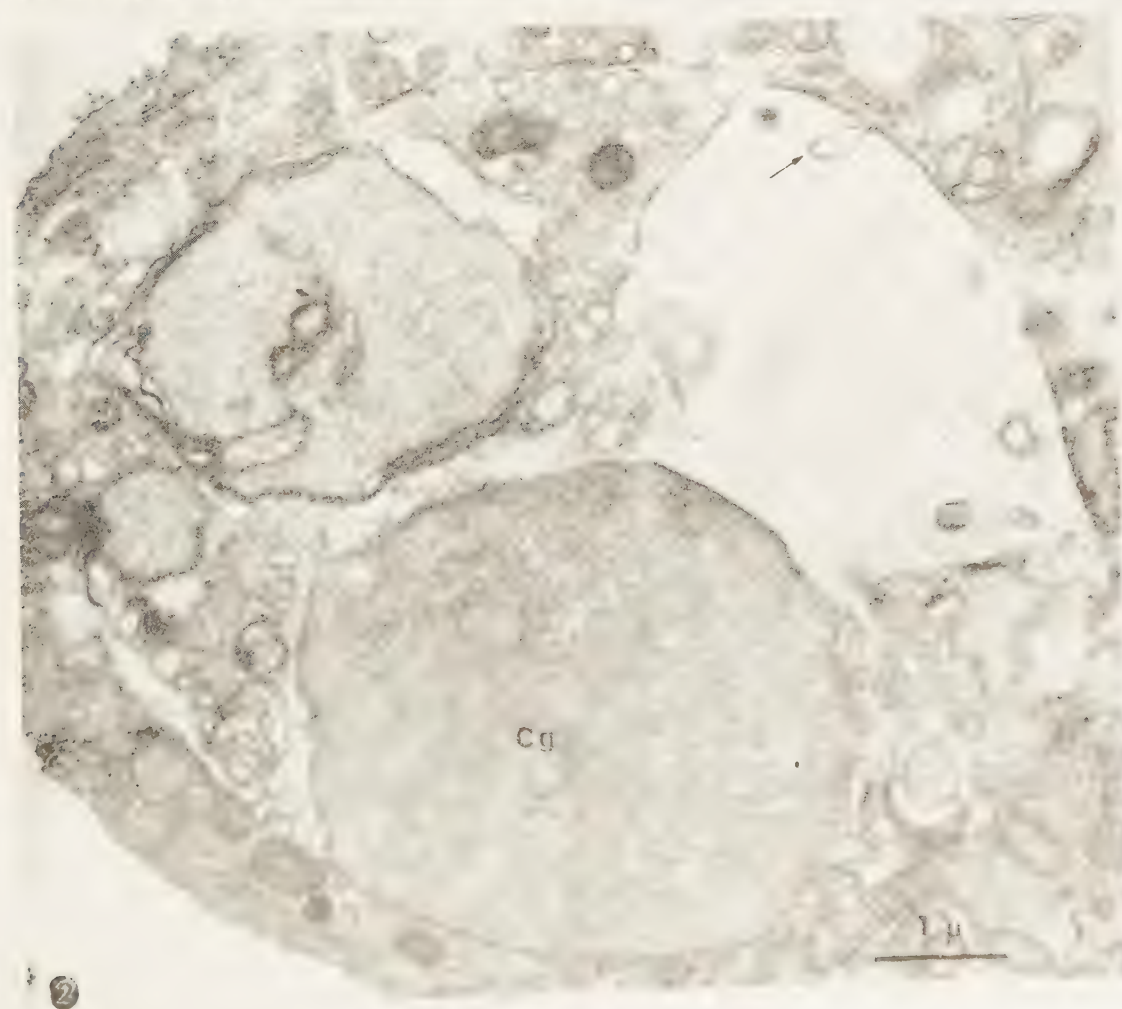
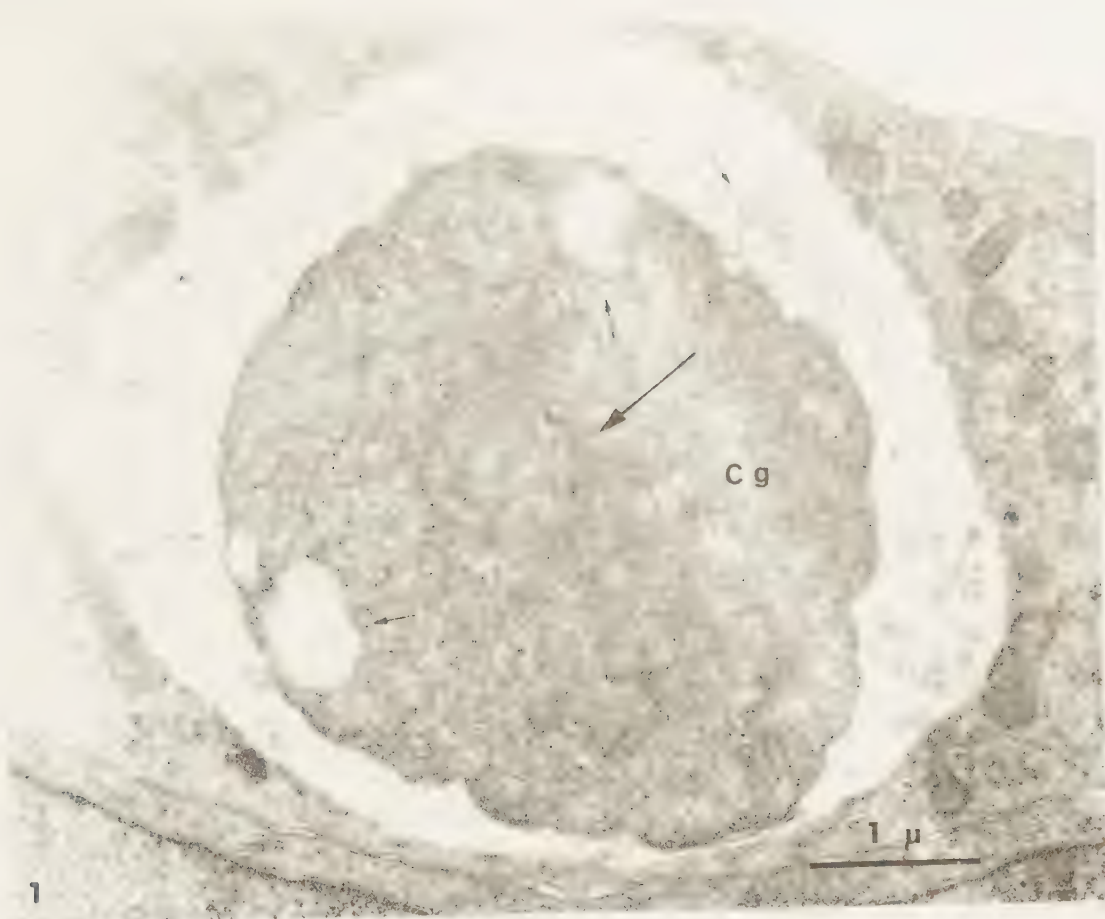
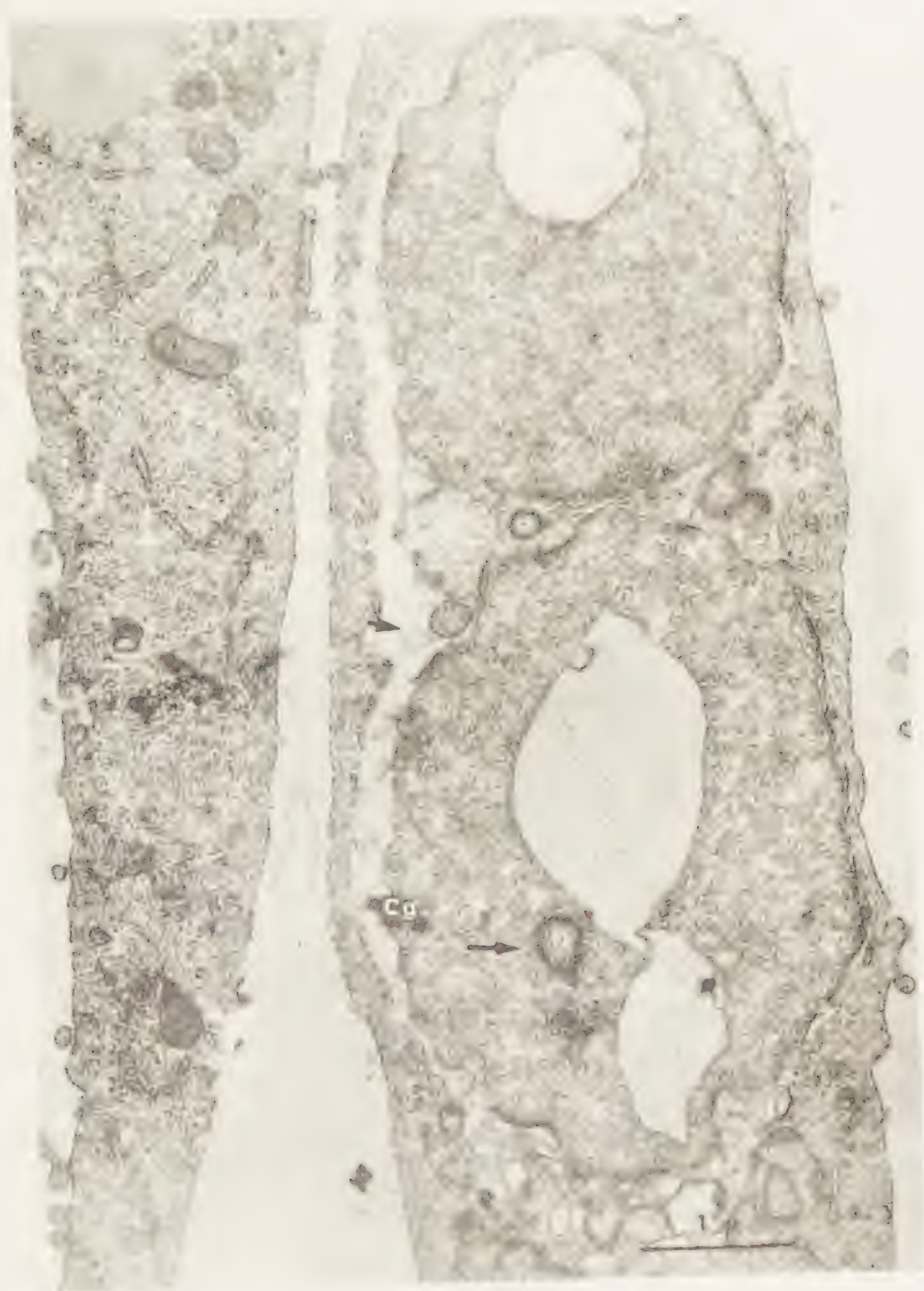


PLANCHE 37

PENICILLINE 50 $\mu\text{g/ml}$

Corps géants, vacuolisés, à l'intérieur d'une inclusion. Des cercles de condensation cytoplasmique apparaissent dans ces corps. La paroi d'une mini-cellule émet une expansion.

X 25200





C O L I S T I N E

PLANCHE 38

COLISTINE 5 $\mu\text{g/ml}$

Les inclusions sont normales.

X 21000

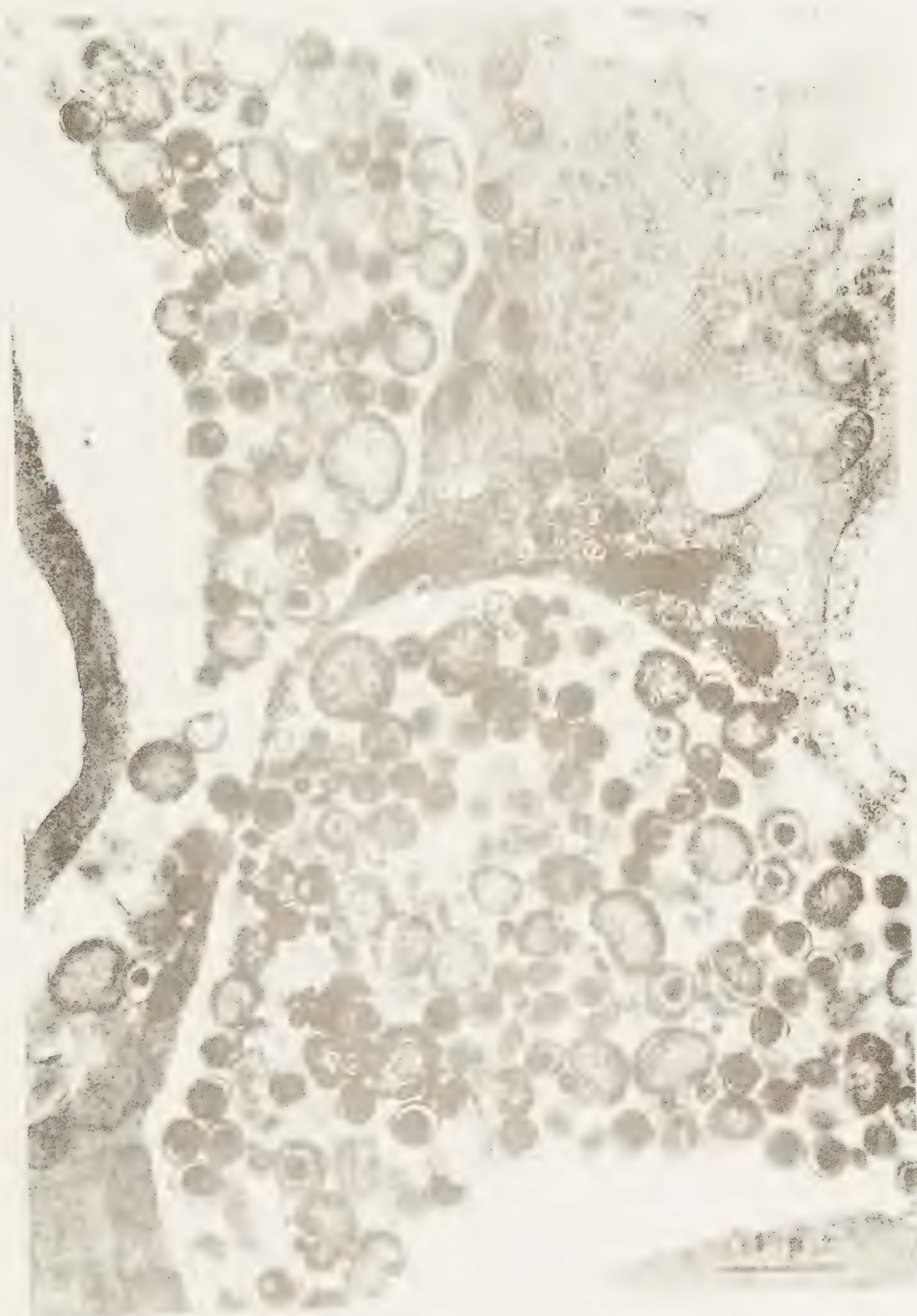


PLANCHE 39

COLISTINE 50 $\mu\text{g/ml}$

*Corps initiaux ; le cytoplasme de la plupart d'entre eux
bourgeonne. A l'extérieur de l'inclusion il semble qu'une particule
isolée se trouve enfermée dans une vacuole dont la membrane est épaissie.*

X 28750

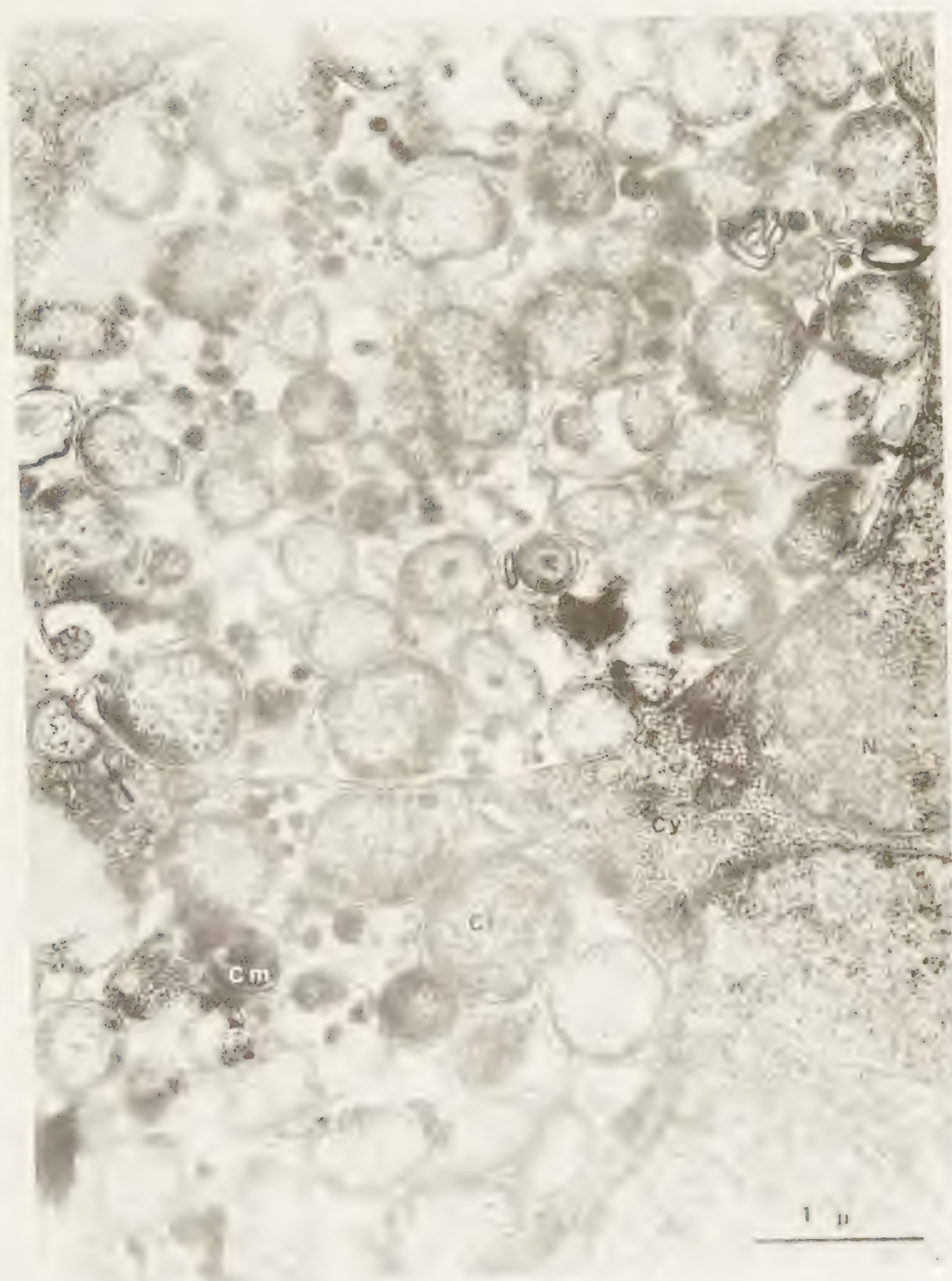


PLANCHE 40

Fig. 1 - COLISTINE 50 $\mu\text{g/ml}$

Des mitochondries proches de l'inclusion chlamydiale paraissent établir un contact étroit avec celle-ci et s'y déverser.

Des particules chlamydiales isolées dans le cytoplasme sont ici encore certies d'une membrane très épaisse.

X 43000

Fig. 2 - COLISTINE 500 $\mu\text{g/ml}$

Corps initiaux dont le cytoplasme se creuse et forme des "anses".

X 28750

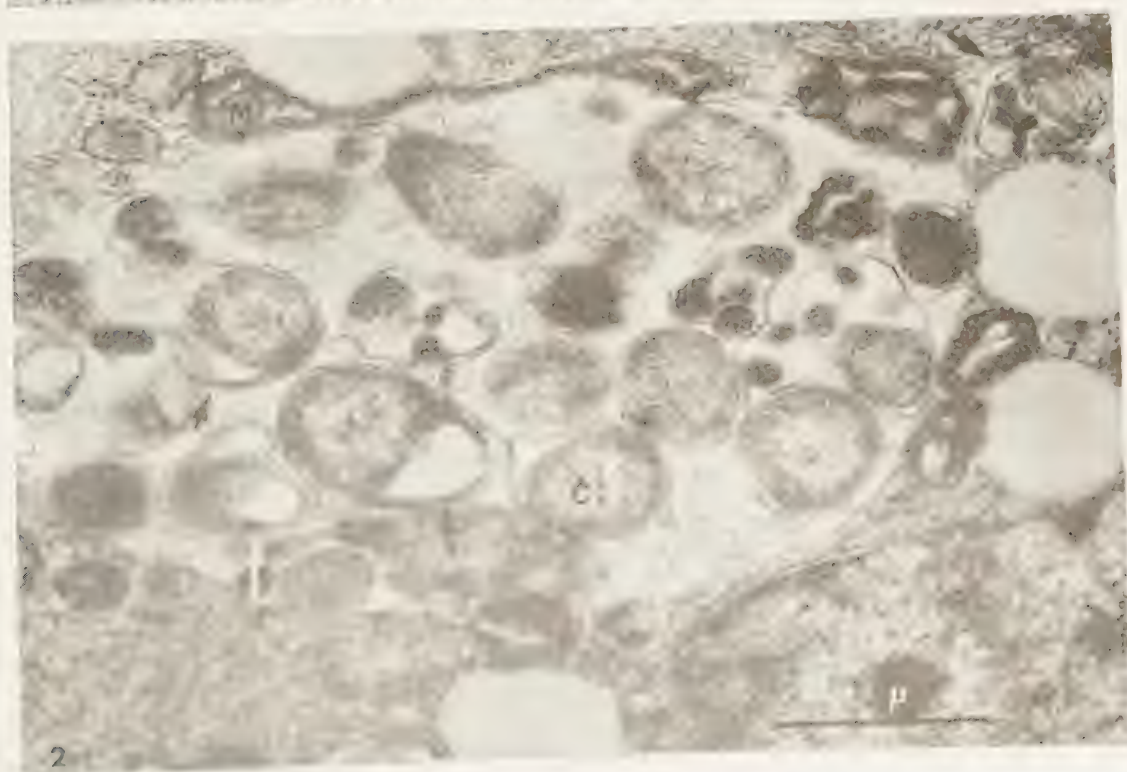
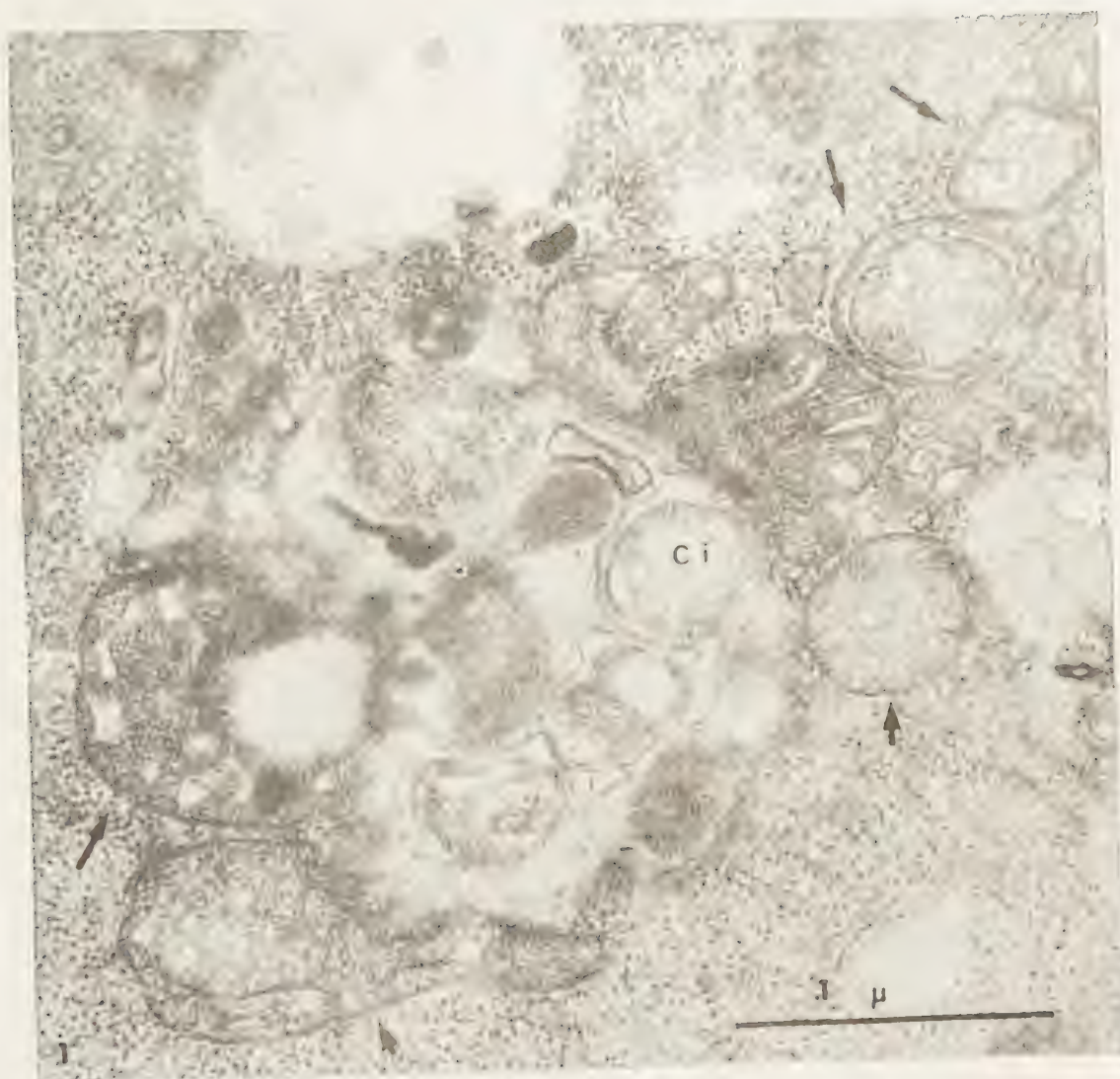


PLANCHE 41

COLISTINE 500 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1 - Corps initiaux bourgeonnant et particule chlamydiale isolée entourée d'une vacuole à membrane épaissie.

X 34400

Fig. 2 - Petite inclusion avec corps initiaux.
Dans ces cellules de nombreuses images évoquant celles de lysosomes secondaires sont rencontrées à proximité des inclusions.

X 51000

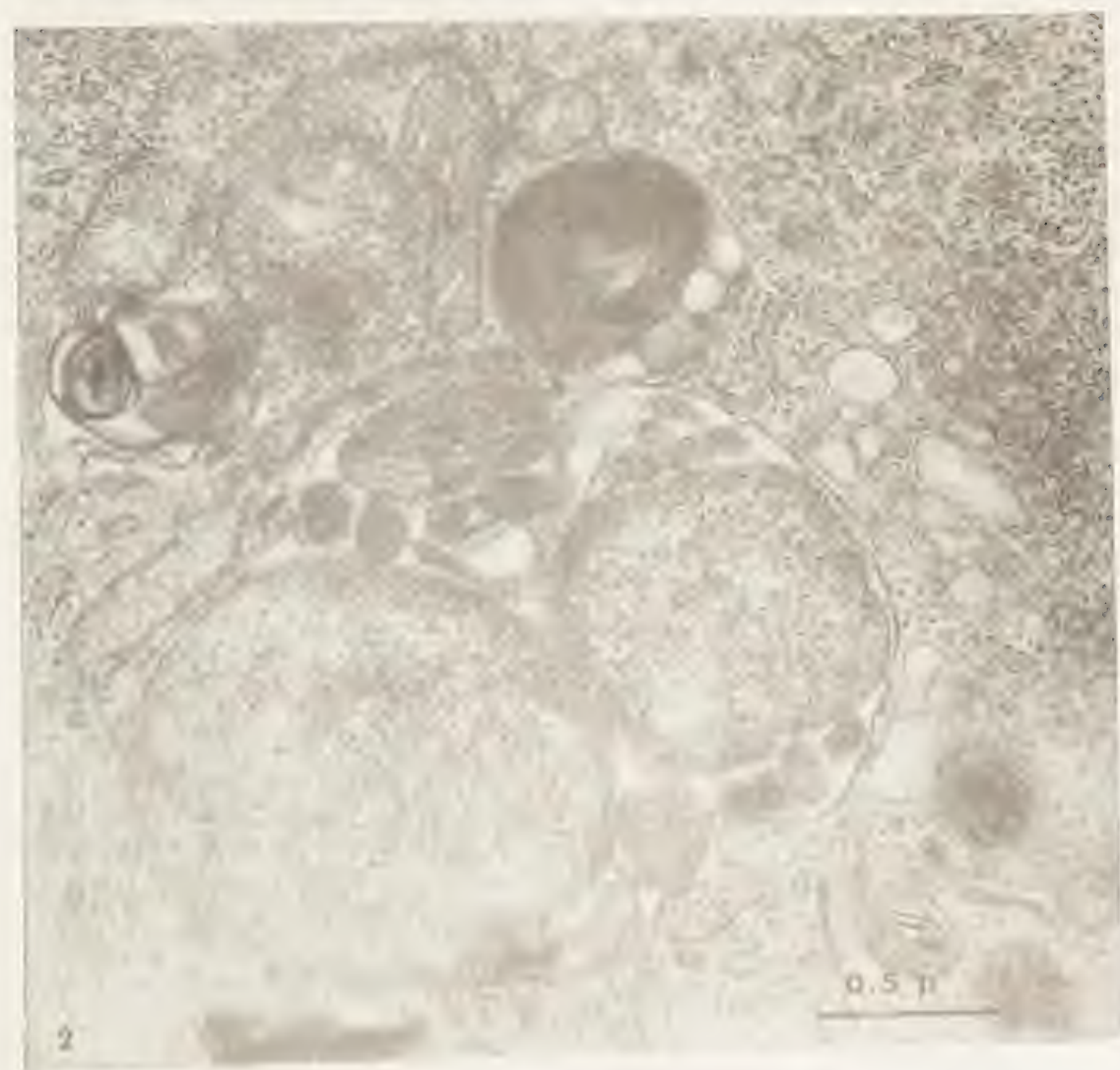
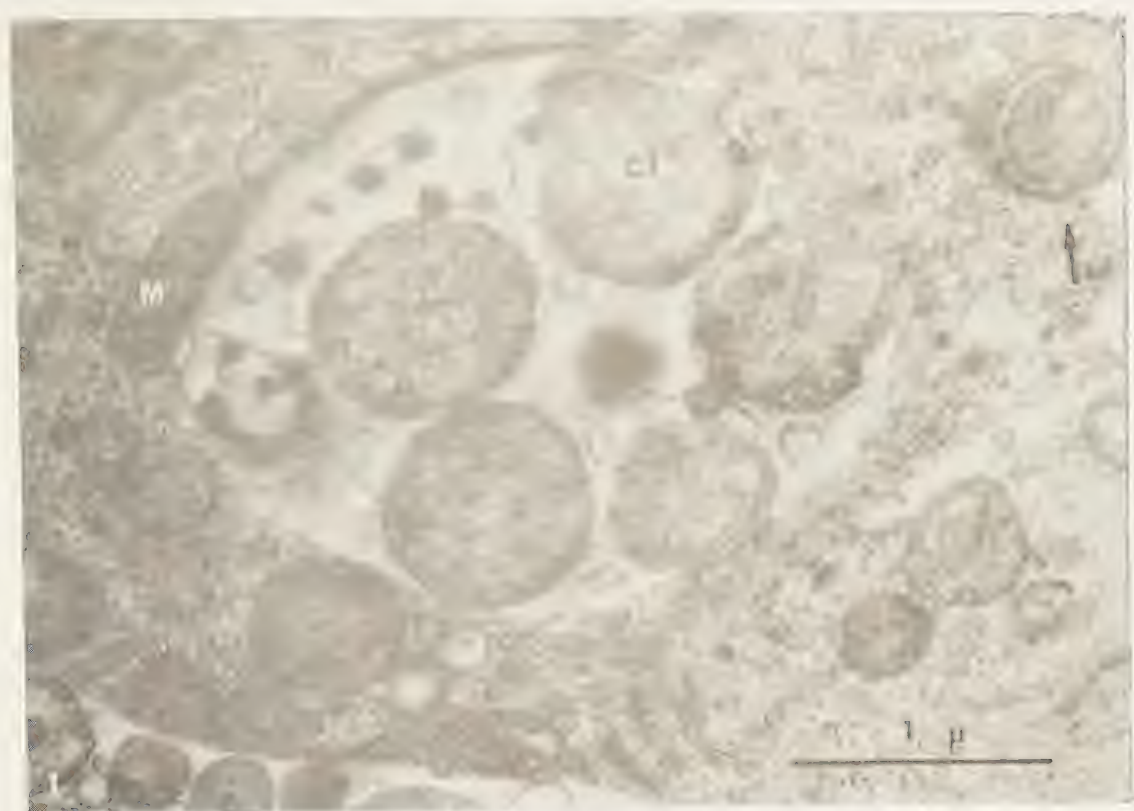


PLANCHE 42

COLISTINE 500 ug/ml

*Grande inclusion normale renfermant les trois types de particules.
Le cytoplasme de quelques corps initiaux est creusé d'une vacuole en forme
"d'anse".*

X 34400

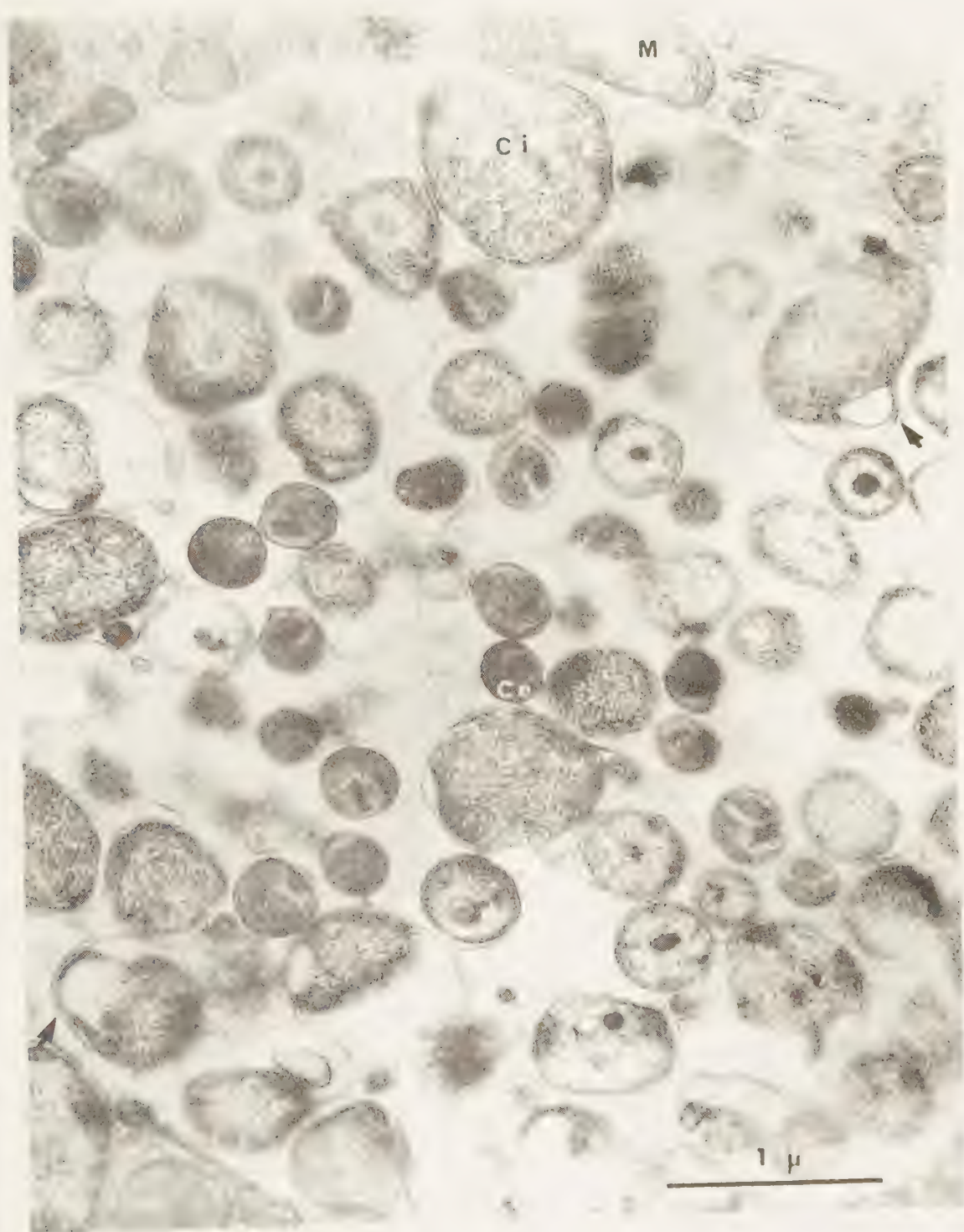
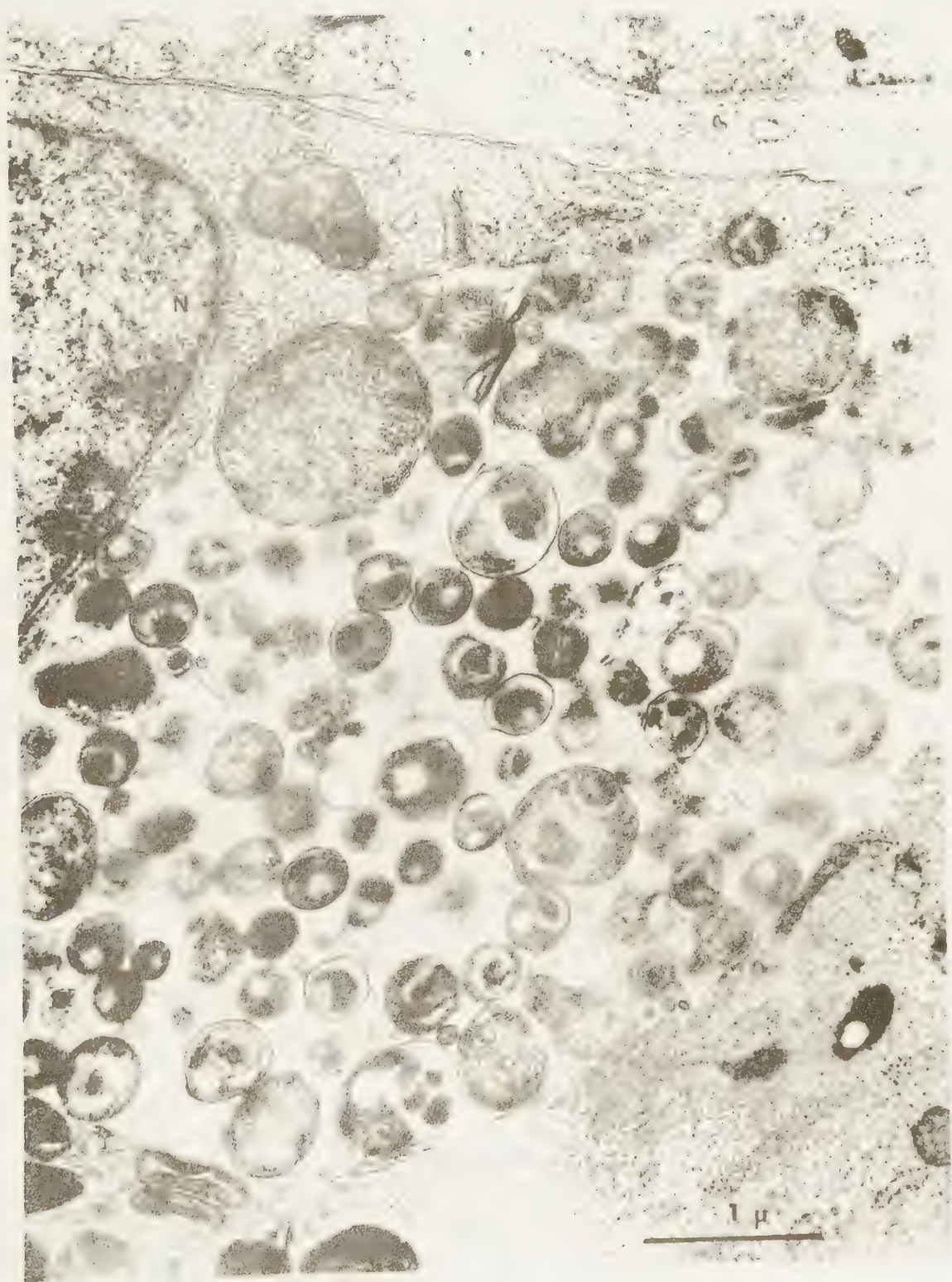


PLANCHE 43

COLISTINE 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Inclusion arrivée à maturité. Les trois types de particules coexistent. Quelques corps initiaux bourgeonnent.

X 28750



B I B L I O G R A P H I E

° °

■

1. ALEXANDER (J.J.)
Separation of protein synthesis in meningopneumonitis agent from that in L cells by differential susceptibility to cycloheximide.
J. Bacteriol. 1968, 95, 327-332.
2. ALEXANDER (J.J.)
Effect of infection with the meningopneumonitis agent on DNA and protein synthesis by its L cell host.
J. Bacteriol. 1969, 97, 653.
3. ANDERSON (D.R.), HOPPS (H.E.), BARILE (M.F.), BERNHEIM (B.C.)
Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus and mycoplasma in tissue culture.
J. Bacteriol. 1965, 90, 1387-1404.
4. ARMSTRONG (J.A.), REED (S.)
Nature and origin of initial bodies in lymphogranuloma venereum.
Nature, 1964, 201, 371-373.
5. ARMSTRONG (J.A.), REED (S.)
Fine structure of lymphogranuloma venereum agent and the effects of penicillin and 5-fluorouracil.
J. Gen. Microbiol. 1967, 46, 435-444.
6. ARMSTRONG (J.A.), VALENTINE (R.C.), FIELDS (C.)
Structure and replication of the trachoma agent in cell cultures as shown by electron microscopy.
J. Gen. Microbiol. 1963, 30, 59-73.
7. BARKER (L.F.)
Determination of antibiotic susceptibility of Rickettsiae and Chlamydiae in BS-C-1 cell cultures.
Antimicrob. agents Chemotherapy 1968, N°8, 425-428.
8. BECKER (Y.)
The cure and eradication of the trachoma agent by the antibiotic rifampicin.
reprinted from Excerpta Medica International Congress series N° 222 Ophtalmology.
Proceeding of the XXI International congress, MEXICO, D.F.
8-14 Mars 1970.
9. BECKER (Y.)
Antitrachoma activity of rifamycin B and 8-O-acetyl rifamycin S.
Nature, 1971, 231, 115-116.
10. BECKER (Y.), ASHER (Y.)
Obligate parasitism of trachoma agent : lack of trachoma development in ethidium bromide treated cells.
Antimicrob. agents Chemotherapy 1972, 1, 171-173

11. BECKER (Y.), ASHER (Y.)
Synthesis of trachoma agent proteins in emetine treated cells.
J. Bacteriol. 1972, 109, 966-970.
12. BECKER (Y.), ASHER (Y.), HIMMEL (N.), ZAKAY-RONES (Z.)
Anti-trachoma activity of rifampicin and rifamycin SV derivatives.
Nature, 1970, 225, 454-455.
13. BECKER (Y.), ASHER (Y.), HIMMEL (N.), ZAKAY-RONES (Z.), MAYTHAR (B.)
Rifampicin inhibition of trachoma agent in vivo.
Nature, 1969, 224, 33-34.
14. BECKER (Y.), HOCHBERG (E.), ZAKAY-RONES (Z.)
Interaction of trachoma elementary bodies with host cells.
Israel J. Med. Sc. 1969, 5, 121-124.
15. BECKER (Y.), LOKER (H.), SAROV (Y.), ASHER (Y.), GUTTER (B.),
ZAKAY-RONES (Z.)
Studies on the molecular biology of trachoma agent.
Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents, 13-26.
Proc. Symp. BOSTON 1970
Nichols Editor - Excerpta Medica 1971.
16. BECKER (Y.), ZAKAY-RONES (Z.)
Rifampicin. A new anti-trachoma drug.
Nature, 1969, 222, 851-853.
17. BEDSON (S.P.)
Observation on the developmental forms of psittacosis virus.
Brit. J. Exptl. Pathol. 1933, 14, 267-277.
18. BEDSON (S.P.), BLAND (J.O.W.)
A morphological study of psittacosis virus with the description
of a developmental cycle.
Brit. J. Exptl. Pathol. 1932, 13, 461-466.
19. BEDSON (S.P.), BLAND (J.O.W.)
The developmental forms of psittacosis virus.
Brit. J. Exptl. Pathol. 1934, 15, 243-247.
20. BERNKOPF (H.), MASHIAH (P.), BECKER (Y.)
Correlation between morphological and biochemical changes and the
appearance of infectivity in FL cell cultures infected with trachoma
agent.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 62-81.
21. BERNKOPF (H.), MASHIAH (P.), BECKER (Y.)
Susceptibility of a trachoma agent grown in Fl cell cultures to
antibiotics and a sulfa drug.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1962, 111, 61-67.

22. BROCK (T.D.)
Chloramphenicol.
Bacteriol. Rev. 1961, 25, 32-48.
23. BROWN (G.M.)
The biosynthesis of folic acid.II. Inhibition by sulfonamides.
J. Biol. Chem. 1962, 237, 536-540
24. BURGESS (R.R.)
RNA polymerase.
Ann. Rev. Biochem. 1971, 40, 711-740.
25. CASEMORE (D.P.)
Gentamicin as a bactericidal agent in virological tissue cultures.
J. Clin. Path. 1967, 20, 298-299.
26. CHATTERJEE (S.N.), DAS (J.)
Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*.
J. Gen. Microbiol. 1967, 49, 1-12.
27. CHRISTOFFERSEN (G.), MANIRE (G.P.)
The toxicity of meningopneumonitis organisms (*Chlamydia psittaci*) at different stages of development.
J. Immunol. 1969, 103, 1085-1088.
28. COLLIER (L.H.)
Trachoma and inclusion blennorrhoea.
Sc. Basis Med. Ann. Rev. 1962, 1, 345-358.
29. COLON (J.I.)
Enzymes for formation of citrovorum factor in members of the psittacosis group of microorganisms.
J. Bacteriol. 1960, 79, 741-746.
30. COLON (J.I.)
The role of folic acid in the metabolism of members of the psittacosis group of microorganisms.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 234-249.
31. COLON (J.I.), MOULDER (J.W.)
Folic acid in purified preparations of members of the psittacosis group of microorganisms.
J. Infect. Dis. 1958, 103, 109-119.
32. CROCKER (T.T.), PELC (S.R.), NIELSEN (B.I.), EASTWOOD (J.M.), BANKS (J.)
Population dynamics and DNA synthesis in Hela cells infected with an ornithosis agent.
J. Infect. Dis. 1964, 115, 105-122.

33. DAVIES (J.), BENVENISTE (R.), KVITEK (K.), OZANNE (B.), YAMADA (T.)
Aminoglycosides : biologic effects of molecular manipulation.
J. Infect. Dis. 1969, 119, 351-354.
34. DAVIES (J.), DAVIS (B.D.)
Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics.
The effect of drug concentration.
J. Biol. Chem. 1968, 248, 3312-3316.
35. DAVIES (J.), GORINI (L.), DAVIS (B.D.)
Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics.
Mol. Pharmacol. 1965, 1, 93-106.
36. DEVOE (I.W.), GILCHRIST (J.E.)
Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro
growth of Neisseria meningitidis.
J. Exp. Med. 1973, 138, 1156-1167.
37. DHIR (S.P.), HAKOMORI (S.), KENNY (G.E.), GRAYSTON (J.T.)
Immunochemical studies on chlamydial group antigen (presence of a
2-keto-3-deoxycarbohydrate as immunodominant group).
J. Immunol. 1972, 109, 116-122.
38. DIXON (H.), KELLERMAN (G.M.), LINNANE (A.W.)
Effect of mikamycin, carbomycin, spiramycin, erythromycin and
paromomycin on growth and respiration of Hela cells.
Arch. Biochem. Biophys. 1972, 152, 869-875.
39. EB (F.), DEVAUCHELLE (G.), ORFILA (J.)
Etude ultrastructurale de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne
(Rickettsiales, Chlamydiaceae).
J. Microscopie 1972, 13, 47-56.
40. EB (F.), ORFILA (J.), DEVAUCHELLE (G.)
Etude de Chlamydia trachomatis. Polymorphisme de l'agent du trachome
en cultures cellulaires.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), PARIS, 1973, 124 B, 41-71.
41. ERLANDSON (R.A.), ALLEN (E.G.)
The ultrastructure of meningopneumonitis.
Virology, 1964, 22, 410-418.
42. FIRKIN (F.C.), LINNANE (A.W.)
Differential effects of chloramphenicol on the growth and respiration
of mammalian cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1968, 32, 398-
43. FRASER (C.E.D.), BERMAN (D.I.)
Type specific antigens in the psittacosis lymphogranuloma venereum
group of organisms.
J. Bacteriol. 1965, 89, 943-948.

44. FRIIS (R.R.)
Interaction of L cells and Chlamydia psittaci : entry of the
parasite and host responses to its development.
J. Bacteriol. 1972, 110, 706-721.
45. FURNESS (G.), GRAHAM (D.M.), REEVE (P.)
The titration of trachoma and inclusion blennorrhoea viruses in
cell cultures.
J. Gen. Microbiol. 1960, 23, 613-619.
46. GAUGLER (R.W.) NEPTUNE (E.M.Jr.), ADAMS (G.M.), SALLEE (T.L.), WEISS (E.),
WILSON (N.N.)
Lipid synthesis by isolated Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1969, 100, 823-826.
47. GEAR (J.H.S.), GORDON (F.B.), JONES (B.R.), BELL (S.D.)
The nomenclature of isolated of virus from trachoma and inclusion
blennorrhoea.
Nature, 1963, 197, 26.
48. GERLOFF (R.K.), RITTER (D.B.), WATSON (R.O.)
DNA homology between the meningopneumonitis agent and related
microorganisms.
J. Infect. Dis. 1966, 116, 197-202.
49. GERLOFF (R.K.), RITTER (D.B.), WATSON (R.O.)
Studies on thermal denaturation of DNA from various Chlamydiae.
J. Infect. Dis. 1970, 121, 65-69.
50. GILL (S.A.), STEWART (R.B.)
Glucose requirements of L cells infected with Chlamydia psittaci.
Can. J. Microbiol. 1970, 16, 997-1001.
51. GIROUD (P.), CAPPONI (M.)
Recherche du pouvoir protecteur sur souris d'un dérivé du Bacillus
colistinus et de la pénicilline sur l'infection locale pulmonai-
re à Rickettsia prowazeki et l'infection générale à Rickettsia tsutsu-
gamushi.
Bull. Soc. Pathol. Exot. 1963, 56, 55-59.
52. GLAUERT (A.M.), THORNLEY (M.J.)
The topography of the bacterial cell-wall.
Ann. Rev. Microbiol. 1969, 23, 159-198.
53. GOLDBERG (I.H.), FRIEDMAN (P.A.)
Antibiotics and nucleic acids.
Ann. Rev. Biochem. 1971, 40, 775-810.
54. GORDON (F.B.), QUAN (A.L.)
Occurrence of glycogen in inclusions of the psittacosis-lymphogranu-
loma venereum-trachoma agents.
J. Infect. Dis. 1965, 115, 186-196.

55. GORDON (F.B.), QUAN (A.L.)
Drugs susceptibilities of the psittacosis and trachoma agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 261-274.
56. GORDON (F.B.), QUAN (A.L.)
Susceptibility of Chlamydia to antibacterial drugs. Tests in cell cultures.
Antimicrob. Agents Chemotherapy. U.S.A. 1972, 2, 242-244.
57. GUTTER (B.), ASHER (Y.), COHEN (Y.), BECKER (Y.)
Studies on the developmental cycle of Chlamydia trachomatis :
isolation and characterisation of the initial bodies.
J. Bacteriol. 1973, 115, 691-702.
58. HAHN (F.E.), SARRE (S.G.)
Mechanism of action of gentamicin.
J. Infect. Dis. 1969, 119, 364-369.
59. HIGASHI (N.)
Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell cultures.
Exptl. Mol. Pathol. 1965, 4, 24-39.
60. HIGASHI (N.), TAMURA (A.), IWANAGA (M.)
Developmental cycle and reproductive mechanism of the meningo-pneumonitis virus in strain L cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 100-121.
61. HITCHINGS (G.H.), BURCHALL (J.J.)
Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy.
Adv. Enzymol. 1965, 27, 417-468.
62. HUENNEKENS (F.M.), OSBORN (M.J.)
Folic acid coenzymes and one-carbon metabolism.
Adv. Enzymol. 1959, 21, 369-446.
63. JAWETZ (E.), HANNA (L.)
Trachoma viruses isolated in United States.
III. Strain specific effects of tetracycline and penicillin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960, 105, 320-323.
64. JENKIN (H.M.)
Preparation and properties of cell-walls of the agent of meningo-pneumonitis.
J. Bacteriol. 1960, 80, 639-647.
65. JENKIN (H.M.), ROSS (M.R.), MOULDER (J.W.)
Species specific antigens from the cell walls of the agent of meningopneumonitis and feline pneumonitis.
J. Immunol. 1961, 86, 123-127.

66. JOHNSTON (P.B.), GRAYSTON (J.T.)
Antibiotic and sulfa drug sensitivity of trachoma virus tested in embryonated eggs.
Presented at the conference on the Biology of the trachoma agent, section of Biol. and Med.
United States Naval Medical Research.
N.Y. Acad. Sci. 26-27 May 1961.
67. JOHNSTON (P.B.), GRAYSTON (J.T.), CHEN (P.C.)
Development of a sulfa resistant variant of trachoma virus.
Presented at the conference on the Biology of the trachoma agent, section of Biol. and Med.
United States Naval Medical Research.
N.Y. Acad. Sci. 26-27 May 1961.
68. JONES (B.R.)
TRIC virus infections in London.
Reprinted from Trachoma and allied infections.
Trans. Ophthal. Soc. U.K. 1961, 81, 367-378.
69. JONES (B.R.)
Ocular syndromes of TRIC virus infection and their possible genital significance.
Brit. J. Vener. Dis. 1964, 40, 3-18.
70. JONES (B.R.)
Advances and prospects in the study of certain diseases due to infections by subgroup A Chlamydia.
Brit. J. Vener. Dis. 1972, 48, N° 1, 13-17.
71. JONES (B.R.), COLLIER (L.H.)
Inoculation of man with inclusion blennorrhoea virus.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 212-226.
72. JONES (B.R.), COLLIER (L.H.), SMITH (C.H.)
Isolation of virus from inclusion blennorrhoea.
Lancet, 1959, 1, 902-905.
73. KAJIMA (M.), SHARON (N.), POLLARD (M.)
Electron microscopy of latent psittacosis virus in Mac Coy cells.
J. Bacteriol. 1964, 88, N° 3, 709-715.
74. KESHISHYAN (H.), HANNA (L.), JAWETZ (E.)
Emergence of rifampin-resistance in Chlamydia trachomatis.
Nature, 1973, 244, 173-174.
75. KINGSBURY (D.T.)
Estimate of the genome size of various microorganisms.
J. Bacteriol. 1969, 98, 1400.
76. KINGSBURY (D.T.)
Lack of DNA homology between species of the genus Chlamydia.
J. Bacteriol. 1968, 96, 1421-1423.

77. KORDOVA (N.), POFFENROTH (L.), WILT (J.C.)
Lysosomes and the "toxicity" of Rickettsiales.
III. Responses of L cells infected with egg-attenuated *Chlamydia psittaci* 6BC strain.
Can. J. Microbiol. 1972, 18, 1343-1348.
78. KORDOVA (N.), WILT (J.C.)
Lysosomes and the "toxicity" of Rickettsiales.
I. Cytochemical studies of macrophages inoculated in vitro with *Chlamydia psittaci* 6BC.
Can. J. Microbiol. 1972, 18, 457-464.
79. KORN (E.D.)
Cell membranes : structure and synthesis.
Ann. Rev. Biochem. 1969, 38, 263-288.
80. LELONG (J.C.), COUSIN (M.A.), GROS (D.), GRUNBERG-MANAGO (M.), GROS (F.)
Streptomycin induced release of f-met-t-RNA from the ribosomal initiation complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971, 42, 530.
81. LEPINAY (A.), ORFILA (J.), ANTEUNIS (A.), BOUTRY (J.M.), ORME-ROSSELLI (L.), ROBINEAUX (R.)
Etude en microscopie électronique du développement et de la morphologie de *Chlamydia psittaci* dans les macrophages de souris.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1970, 119, 222-231.
82. LEPINAY (A.), ROBINEAUX (R.), ORFILA (J.), MONCEL (C.), COET (H.), BOUTRY (J.M.)
Analyse en microcinématographie à contraste de phase du développement intra-cellulaire de *Chlamydia psittaci*.
Arch. Ges. Virusforsch. 1971, 35, 161-176.
83. LEPINAY (A.), ROBINEAUX (R.), ORFILA (J.), ORME-ROSSELLI (L.), BOUTRY (J.M.)
Ultrastructure et cytochimie ultrastructurale des membranes de *Chlamydia psittaci*.
Arch. Ges. Virusforsch. 1971, 33, 271-280.
84. LESTER (W.)
Rifampin : a semi-synthetic derivation of rifamycin . A prototype for the future.
Ann. Rev. Microbiol. U.S.A. 1972, 26, 85-102.
85. LEVADITI (J.C.), ROGER (F.), DESTOMBES (P.)
Tentative de classification des Chlamydiaceae (RAKE 1955) tenant compte de leurs affinités tissulaires et de leur épidémiologie.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1964, 107, 656-662.
86. LIN (H.S.)
Stability of the nucleic acids of L cells after infection with the meningopneumonitis agent.
J. Bacteriol. 1968, 96, 2049-2053.

87. LIN (H.S.)
Inhibition of thymidine kinase activity and DNA synthesis in L cells infected with the meningopneumonitis agent.
J. Bacteriol. 1968, 96, 2054.
88. LIN (H.S.), MOULDER (J.W.)
Patterns of response to sulfadiazine, d-cycloserine and d-alanine in members of the psittacosis group.
J. Infect. Dis. 1966, 116, 372-376.
89. LITWIN (J.)
Growth of the agent of trachoma in the embryonated egg.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 145-162.
90. LITWIN (J.), OFFICER (J.E.), BROWN (A.), MOULDER (J.W.)
A comparative study of the growth cycles of different members of the psittacosis group in different host cells.
J. Infect. Dis. 1961, 109, 251-279.
91. LUCAS-LENARD (J.), LIPMAN (F.)
Protein biosynthesis.
Ann. Rev. Biochem. 1971, 40, 409-448.
92. LUZATTO (L.), APIRION (D.), SCHLESSINGER (D.)
Mechanism of action of streptomycin in E. coli : interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1968, 60, 873-880.
93. MAGGI (N.), PASQUALUCCI (C.R.), BALLOTA (R.), SENSI (P.)
Rifampicin : a new orally active rifamycin.
Chemotherapia. 1966, 11, 285-292.
94. MAKINO (S.), JENKIN (H.M.), YU (H.M.), TOWNSEND (D.)
Lipid composition of Chlamydia psittaci grown in monkey kidney cells in defined medium.
J. Bacteriol. 1970, 103, 62.
95. MALIK (V.S.)
Chloramphenicol.
Adv. Appl. Microbiol. 1972, 15, 297-336.
96. MANIRE (G.P.)
Structure of purified cell walls of dense forms of meningopneumonitis organisms.
J. Bacteriol. 1966, 91, 409-413.
97. MANIRE (G.P.), TAMURA (A.)
Preparation and chemical composition of the cell walls of mature infectious dense forms of meningopneumonitis organisms.
J. Bacteriol. 1967, 94, 1178-1183.

98. MARTIN (H.H.), HEILMANNE (H.D.), PREUSSER (H.J.)
State of the rigid-layer in cell walls of some Gram negative bacteria.
Arch. Mikrobiol. 1972, 83, 332-346.
99. MATSUBARA (M.), MITSUI (Y.),
Effets de quelques antibiotiques sur la croissance de l'agent du
trachome observé au microscope électronique.
Rev. Int. Trachome 1968, 45, 29-33.
100. MATSUMOTO (A.), HIGASHI (N.), TAMURA (A.)
Electron microscopic observations on the effects of polymyxin B
sulfate on cell walls of Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1973, 113, 357-364.
101. MATSUMOTO (A.), MANIRE (G.P.)
Electron microscopic observations on the effects of penicillin on
the morphology of Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1970, 101, 278-285.
102. MATSUMOTO (A.), MANIRE (G.P.)
Electron microscopic observations on the fine structure of cell walls
of Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1970, 104, 1332-1337.
103. MILANESI (G.), CIFERRI (O.)
Studies on the mechanism of action of gentamicin. Effect on protein
synthesis in cell free extracts of Escherichia coli.
Biochemistry, 1966, 5, 3926-3935.
104. MITSUI (Y.)
Relation between trachoma and inclusion conjunctivitis.
Rev. Int. Trachome, 1964, 3, 252-261.
105. MITSUI (Y.), FUJIMOTO (M.), KAJIMA (M.)
Development and morphology of trachoma agent in the yolk sac cell as
revealed by electron microscopy.
Virology, 1964, 23, 30-45.
106. MITSUI (Y.), KAJIMA (M.), NISHIMURA (A.), KONISHI (K.)
Morphology of trachoma agent in conjunctiva and chick embryo.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 131-144.
107. MITSUI (Y.), KONISHI (K.), KINOUCHI (T.), MIKI (T.)
Trachoma : its treatment with a long acting sulfonamide administered
orally.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1964, 13, 488-491.
108. MITSUI (Y.), KONISHI (K.), NISHIMURA (A.), KAJIMA (M.), TAMURA (O.)
ENDO (K.)
Experiments in human volunteers with trachoma and inclusion conjunc-
tivitis agent.
Brit. J. Ophthalmol. 1962, 46, 651-659.

109. MITSUI (Y.), SUZUKI (A.), HANABUSA (J.), MINODA (R.), OGATA (S.),
FUKUSHIMA (S.), MIURA (M.)
Structures of the initial bodies of Trachoma inclusion as revealed
in section by electron microscopy.
Virology, 1958, 6, 137-149.
110. MITSUI (Y.), TAMURA (O.), MATSUBARA (M.), FUJIMOTO (M.)
Effect of antibiotics in the treatment of eye diseases caused by
P.L.T. agents : on analysis by electron microscopy.
Acta Conc. Ophthal. Ger. 1966, 2, 698-704.
111. MODOLELL(J.), DAVIS (B.D.)
Rapid inhibition of polypeptide chain extension by streptomycin.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1968, 61, 1279-1286.
112. MOORE (D.E.), MOULDER (J.W.)
Autoradiographic study of DNA synthesis in L cells infected with the
agent of meningopneumonitis.
J. Bacteriol. 1966, 92, 1128-1132.
113. MORGAN (H.R.)
Studies on the relationship of pteroylglutamic acid to the growth of
psittacosis virus (strain 6 B.C.).
J. Exp. Med. 1948, 88, 285-294.
114. MOULDER (J.W.)
Structure and chemical composition of isolated particles.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 92-99.
115. MOULDER (J.W.)
Glucose metabolism of L cells before and after infection with
Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1970, 104, 1189.
116. MOULDER (J.W.), GRISSE (D.L.), BRUBAKER (R.R.)
Enzymes of glucose catabolism in a member of the psittacosis group.
J. Bacteriol. 1965, 89, 810.
117. MOULDER (J.W.), NOVOSSEL (D.L.), TRIBBY (I.C.)
Diaminopimelic acid decarboxylase of the agent of meningopneumonitis.
J. Bacteriol. 1963, 85, 701-706.
118. MURRAY (R.G.E.)
On the cell wall structure of Spirillum serpens.
Canad. J. Microbiol. 1963, 9, 381-392.
119. MURRAY (R.G.E.), STEED (P.), ELSON (H.E.)
The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of
Escherichia coli and other Gram negative bacteria.
Can. J. Microbiol. 1965, 11, 547-560.

120. NABLI (B.)
Traitement du Trachome à la rifampicine. Note explicative.
Ann. Oculist. 1972, 205, 299-307.
121. NEWTON (B.A.)
The properties and mode of action of the polymyxins.
Bacteriol. Rev. 1956, 20, 14-27.
122. ORFILA (J.)
Etude de l'action cytopathogène du virus de la lymphogranulomatose
vénérienne en culture de tissus.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1962, 102, 249-255.
123. ORMSBEE (R.A.), WEISS (E.)
Trachoma agent : glucose utilization by purified suspensions.
Science, 1963, 142, 1077-1078.
124. OSBORN (M.J.)
Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall.
Ann. Rev. Biochem. 1969, 38, 501-538.
125. OSSOWSKI (L.), BECKER (Y.), BERNKOPF (H.)
Aminoacid requirements of trachoma strains and other agents of the
P.L.T. group in cell culture.
Israel J. Med. Sc. 1965, 1, 186-193.
126. OXENDER (D.L.)
Membrane transport.
Ann. Rev. Biochem. 1972, 41, 777-814.
127. PAGE (L.A.)
Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia
Jones, Rake and Stearns.
Int. J. System. Bact. 1968, 18, 51-66.
128. PARK (J.T.), STROMINGER (J.L.)
Mode of action of penicillin.
Science, 1957, 125, 99-101.
129. PATTE (J.C.), CHABBERT (Y.A.)
Modalités d'action antibactérienne de la colistine.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1961, 100, Suppl. N° 4, 32-43.
130. PELC (S.R.), CROCKER (T.T.)
Differences in the utilization of labeled precursors for the
synthesis of DNA in cell nuclei and psittacosis virus.
Biochem. J. 1961, 78, 20.
131. PERKINS (H.R.), ALLISON (A.L.)
Cell-wall constituents of Rickettsiae and Psittacosis-lymphogranuloma
organisms.
J. gen. Microbiol. 1963, 30, 469-480.

132. PERKINS (H.R.), NIETO (M.)
The significance of D-alanyl-D-alanine termini in the biosynthesis of bacterial cell walls and the action of penicillin vancomycin and ristocetin.
Pure Appl. Chem. 1973, 35, 371-381.
133. POLLARD (M.), STARR (T.J.), MOORE (R.W.), TANAMI (Y.)
Cytochemical changes in human amnion cells infected with psittacosis virus.
Nature, 1960, 188, 770.
134. POLLARD (M.), TANAMI (Y.)
The effects of antibiotics on trachoma virus in tissue cultures.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1961, 107, 508-511.
135. POLLARD (M.), TANAMI (Y.)
Cytochemistry of trachoma virus replication in tissue cultures.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 50-61.
136. RAPAPPORT (N.), CURTISS (R.), JENKIN (H.M.), MOULDER (J.W.)
Stability of nucleic acids in meningopneumonitis virus.
Bacteriol. Proc. 1960, 60, 112.
137. REEVE (P.), TAVERNE (J.)
Some properties of the complement fixing antigens of the agents of trachoma and inclusion blennorrhoea and the relationship of the antigens to the developmental cycle.
J. Gen. Microbiol. 1962, 27, 501-508.
138. REEVE (P.), TAVERNE (J.)
Observations on the growth of trachoma and inclusion blennorrhoea viruses in embryonate eggs.
J. Hyg. Camb. 1963, 61, 67-75.
139. REEVE (P.), TAVERNE (J.)
Strain differences in the behavior of TRIC agents in cell cultures.
Amer. J. Ophtal. 1967, 63, 1167-1173.
140. RICE (C.E.)
The carbohydrate matrix of the epithelial cell inclusion in trachoma.
Amer. J. Ophtal. 1938, 19, 1-8.
141. RIVA (S.), SILVESTRI (L.G.)
Rifamycins : a general view.
Ann. Rev. Microbiol. U.S.A. 1972, 26, 199-224.
142. ROBERTSON (J.D.)
The ultrastructure of cell membrane and their derivatives.
Biochem. Soc. Symp. 1959, 16, 3-43.

143. ROTHFIELD (L.), FINKELSTEIN (A.)
Membrane biochemistry.
Ann. Rev. Biochem. 1968, 37, 463-496.
144. ROWBURY (R.J.)
Bacterial cell division : its regulation and relation to DNA synthesis.
Sci. Prog., G.B. 1972, 60, 169-188.
145. RUDIN (A.), HEALEY (A.), PHILLIPS (C.H.), GUMP (D.W.), FORSYTH (B.R.)
Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture.
Applied Microbiol. 1970, 20, 989-990.
146. SAROV (I.), BECKER (Y.)
RNA in the elementary bodies of trachoma agent.
Nature, 1968, 217, 849-852.
147. SAROV (I.), BECKER (Y.)
Trachoma agent DNA.
J. Mol. Biol. 1969, 42, 581-589.
148. SAROV (I.), BECKER (Y.)
DNA dependant RNA polymerase in trachoma elementary bodies.
In Trachoma and related disorders caused by Chlamydial agents.
Proc. Symp. BOSTON, 1970.
Nichols Editors 1971, 27-33.
149. SAROV (I.), BECKER (Y.), BERNKOPF (H.)
Studies on the nucleic acids of the trachoma agent.
Israel J. Med. Sci. 1966, 2, 661.
150. SCHACHTER (J.)
Recommended criteria for the identification of trachoma and inclusion
conjunctivitis agent.
J. Infect. Dis. 1970, 122, 105-107.
151. SCHECHTER (E.M.)
Synthesis of nucleic acid and protein in L cells infected with the
agent of meningopneumonitis.
J. Bacteriol. 1966, 91, 2069-2080.
152. SENSI (P.), BALLOTTA (R.), GRECO (A.M.), GALLO (G.G.)
Activation of rifomycin B and rifomycin O. Production and properties
of rifomycin S and rifomycin SV.
Il. Farmaco, 1961, 16, 166-180.
153. SHIAO (L.C.), WANG (S.P.), GRAYSTON (J.T.)
Sensitivity and resistance of TRIC agents to penicillin tetracycline
and sulfa drugs.
Amer. J. Ophtalm. 1967, 63, 1558-1568.

154. SOWA (J.), RACE (M.W.)
Sensitivity of trachoma agent to streptomycin and related antibiotics.
J. Hyg. Camb. 1971, 69, 709-716.
155. STARR (T.J.), POLLARD (M.), TANAMI (Y.), MOORE (R.W.)
Cytochemical studies with psittacosis virus by fluorescence microscopy.
Tex. Repts Biol. Med. 1960, 18, 501-514.
156. STORZ (J.), PAGE (L.A.)
Taxonomy of the Chlamydia : reasons for classifying organisms of the
genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydia-
les ord. nov.
Internation. J. syst. Bacteriol. 1971, 21, 332-334.
157. STROMINGER (J.L.), BLUMBERG (P.M.), SUGINAKA (H.), UMBREIT (J.), WICKUS (G.)
How penicillin kills bacteria : progress and problems.
Proc. R. Soc. Lond. 1971, 179, 369-383.
158. TAJIMA (M.), SAMEJIMA (T.), NOMURA (Y.)
Morphology of meningopneumonitis virus exposed to penicillin as ob-
served with the electron microscopy.
J. Bacteriol. 1959, 77, 23-34.
159. TAMURA (A.)
Isolation of ribosome particles from meningopneumonitis organisms.
J. Bacteriol. 1967, 93, 2009-2016.
160. TAMURA (A.), HIGASHI (N.)
Purification and chemical composition of meningopneumonitis virus.
Virology, 1963, 20, 596-604.
161. TAMURA (A.), MANIRE (G.P.)
Preparation and chemical composition of the cell membranes of deve-
lopmental reticulate forms of meningopneumonitis organisms.
J. Bacteriol. 1967, 94, 1184-1188.
162. TAMURA (A.), MANIRE (G.P.)
Effect of penicillin on the multiplication of meningopneumonitis
organisms (Chlamydiapsittaci).
J. Bacteriol. 1968, 96, 875-880.
163. TAMURA (A.), MATSUMOTO (A.), HIGASHI (N.)
Purification and chemical composition of reticulate bodies of the
meningopneumonitis organisms.
J. Bacteriol. 1967, 93, 2003-2008.
164. TAMURA (A.), MATSUMOTO (A.), MANIRE (G.P.), HIGASHI (N.)
Electron microscopic observations on the structure of the envelopes
of mature elementary bodies and developmental reticulate forms of
Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1971, 105, 355-360.

165. TANAMI (Y.), POLLARD (M.), STARR (T.J.)
Replication pattern of psittacosis virus in a tissue culture system.
Virology, 1961, 15, 22-29.
166. TANAMI (Y.), TAMADA (Y.)
Miniature cell formation in Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1973, 114, 408-412.
167. TARIZZO (M.L.), NABLI (B.)
Etudes sur le trachome, 7. Action comparée des antibiotiques sur
différents virus du groupe trachome cultivés dans les œufs embryonnés.
Bull. Org. Mond. Santé, 1963, 29, 289-298.
168. TARIZZO (M.L.), NATAF (R.), DAGHFOUS (T.)
Etudes sur le trachome, 2. Action des antibiotiques sur le virus du
trachome cultivé dans les oeufs embryonnés.
Bull. Org. Mond. Santé, 1961, 24, 107-113.
169. TAVERNE (J.), BLYTH (W.A.), REEVE (P.)
Toxicity of the agents of trachoma and inclusion conjunctivitis.
J. Gen. Microbiol. 1964, 37, 271-275.
170. TIPPER (D.J.), STROMINGER (J.L.)
Mechanism of action of penicillins : a proposal based on their struc-
tural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1965, 54, 1133-1141.
171. TRIBBY (I.I.E.)
Cell wall synthesis by Chlamydia psittaci growing in L cells.
J. Bacteriol. 1970, 104, 1176.
172. TRIBBY (I.I.E.), FRIIS (R.R.), MOULDER (J.W.)
Effect of chloramphenicol rifampicin, and nalidixic acid on
Chlamydia psittaci growing in L cells.
J. Infect. Dis. 1973, 127, 155-163.
173. TRIBBY (I.I.E.), MOULDER (J.W.)
Availability of bases and nucleosides as precursors of nucleic acids in
L cells and in the agent of meningopneumonitis.
J. Bacteriol. 1966, 91, 2362-2367.
174. UMBREIT (W.W.), TONHAZY (N.E.)
The action of streptomycin in the action of streptomycin in tissue
homogenates.
J. Bacteriol. 1949, 58, 769-776.
175. UMEZAWA (H.), MIZUNO (S.), YAMAZAKI (H.), NITTA (K.)
Inhibition of DNA dependant RNA synthesis by rifamycins.
J. Antibiot. 1968, 21, 234-236.

176. VASQUEZ (D.), STAEHELIN (T.), CELMA (M.L.), BATTANER (E.),
FERNANDEZ-MUNOZ (R.), MONRO (R.E.)
Inhibitions as tools in elucidation ribosomal function.
"In Inhibitors, tools in cell research"
Bücher and Sies Editors, 1969, 100-125.
177. VENABLE (J.H.), COGGESHALL (R.)
A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.
J. Cell. Biol. 1964, 25, 407-408.
178. VENDER (J.), MOULDER (J.W.)
Initial step in catabolism of glucose by the meningopneumonitis
agent.
J. Bacteriol. 1967, 94, 867-869.
179. VOELZ (H.), DWORKIN (M.)
Fine structure of myxococcus xanthus during morphogenesis.
J. Bacteriol. 1962, 84, 943-952.
180. WEHRLI (W.), KNUSEL (F.), SCHMID (K.), STAEHELIN (M.)
Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1968, 61, 667-673.
181. WEHRLI (W.), NUESCH (J.), KNUSEL (F.), STAEHELIN (M.)
Action of rifamycins on RNA polymerase.
Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, 215-217.
182. WEHRLI (W.), STAEHELIN (M.)
The rifamycins relation of chemical structure and action on RNA
polymerase.
Biochem. Biophys. Acta, 182, 24-29.
183. WEINSTEIN (M.J.), WAGMAN (G.H.), ODEN (E.M.), MARQUEZ (J.A.)
Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin
complex.
J. Bacteriol. 1967, 94, 789-790.
184. WEISBLUM (B.), DAVIES (J.)
Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome.
Bacteriol. Rev. 1968, 32, 493-528.
185. WEISS (E.)
The effect of antibiotics on agents of the psittacosis-lymphogranu-
loma group. I. The effect of penicillin.
J. Infect. Dis. 1950, 87, 249-263.
186. WEISS (E.)
Adenosine triphosphate and other requirements for the utilization of
glucose by agents of the psittacosis-trachoma group.
J. Bacteriol. 1965, 90, 243-253.

187. WEISS (E.)
Transaminase activity and other enzymatic reactions involving pyruvate and glutamate in Chlamydia (psittacosis-trachoma group).
J. Bacteriol. 1967, 93, 177.
188. WEISS (E.)
Evolution of Chlamydia.
Reprinted from Excerpta Medica 1971.
Trachoma and related disorders caused by Chlamydial agents.
Proc. Symp. BOSTON 1970, 3-12.
189. WEISS (E.), MYERS (W.F.), DRESSLER (H.R.), CHUN-HOON (H.)
Glucose metabolism by agents of the psittacosis-trachoma group.
Virology, 1964, 22, 551-562.
190. WEISS (E.), NEPTUNE (E.M.Jr.), GAUGLER (R.W.)
Influence of gas environment on catabolic activities and on reoxidation of reduced NADP in Chlamydia.
J. Bacteriol. 1968, 96, 1567.
191. WEISS (E.), SCHRAMEK (S.), WILSON (N.N.), NEWMAN (L.W.)
Deoxyribonucleic acid heterogeneity between human and murine strains of Chlamydia trachomatis.
Infect. and Immun. 1970, 2, 24-28.
192. WEISS (E.), WILSON (N.N.)
Role of exogenous ATP in catabolic and synthetic activities of Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1969, 97, 719.
193. WENTWORTH (B.B.)
Use of gentamicin in the isolation of subgroup A Chlamydia.
Antimicrob. Agents Chemotherapy, 1973, 3, 698-702.
194. YOTSUYANAGI (Y.)
Mise en évidence au microscope électronique des chromosomes de la levure par une coloration spécifique.
C.R. Acad. Sci. 1960, 250, 1522.
195. ZAGORSKA (L.), DONDON (J.), LELONG (J.C.), GROS (F.), GRUNBERG-MANAGO (M.)
Decoding site of initiation transfer RNA.
Biochimie, 1971, 53, 63-70.

